

**„*In vitro* Untersuchung der rearrangierten DNA-Vakzine
pTHamp-HPV16E7SH zur Beurteilung ihrer Immunogenität im
Humansystem“**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller- Universität Jena**

von Diplom-Biologin Michaela Pes

geboren am 27.12.1970 in Wolfsburg

1. Gutachter:
2. Gutachter:
3. Gutachter:

Tag der Doktorprüfung:

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Selbstständigkeitserklärung und Erklärung über frühere oder laufende Promotionsverfahren

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist, ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt habe und alle benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und benutzten Quellen angegeben habe.

Alle Personen, die mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie der Herstellung des Materials unterstützt haben, habe ich benannt.

Ich habe nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen.

Dritte Personen haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der Dissertation stehen.

Die vorliegende Arbeit wurde nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Sie wurde ebenso nicht als Dissertation bei einer anderen Hochschule eingereicht.

Jena, Oktober 2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Humane Papillomviren (HPV).....	10
1.1.1 Epidemiologie.....	10
1.1.2 Struktur von HPV.....	11
1.1.3 Regulation der viralen Replikation in der Wirtszelle.....	11
1.1.4 Virusreplikation und Infektionszyklus.....	12
1.2. Rolle des Immunsystems bei der Kontrolle von HPV-Infektionen.....	13
1.2.1 zelluläre Immunantwort.....	14
1.2.2 humorale Immunantwort.....	15
1.2.3 Dendritische Zellen.....	16
1.3 HPV-Vakzine	17
1.3.1 prophylaktische Vakzine	18
1.3.2 therapeutische Vakzine.....	18
1.3.2 Vakzinierung mit einer rearrangierten HPV16E7 DNA-Vakzine.....	18
1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit - In vitro Untersuchungen zur Immunogenität einer HPV16E7 DNA-Vakzine im humanen System.....	20
1.4.1 Methodenentwicklung.....	20
1.4.2 Bestimmung der Immunogenität der Vakzine in vitro.....	21
1.4.3 Bestimmung der Immunogenität ex vivo in tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL).....	21

2. Material und Methoden

2.1 Material.....	22
2.1.1 Geräteliste.....	22
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	22
2.1.3 Chemikalien.....	22
2.1.4 Kulturmedien und Antibiotika.....	22
2.1.4.1 für eukaryontische Zellen.....	22
2.1.4.2 für Bakterien.....	22
2.1.4.3 Antibiotika.....	22
2.1.5 Zytokine.....	22
2.1.6 Antikörper.....	22
2.1.6.1 Antikörper für die Durchflußzytometrie.....	22

2.1.6.2 Antikörper für INF- γ ELISpot.....	23
2.1.6.3 Antikörper für Western Blot.....	23
2.1.6.4 Antikörper und Nachweisreagenz für Talon ELISA.....	23
2.1.7 Peptide.....	24
2.1.8 Enzyme, Oligonukleotide, Kits, Plasmide, RNA.....	24
2.1.8.1 Enzyme.....	24
2.1.8.2 Oligonukleotide.....	24
2.1.8.3.Kits.....	24
2.1.8.4 Plasmide.....	25
2.1.8.5 RNA.....	25
2.1.9 Eukaryontische Zelllinien und Bakterienstämme.....	25
2.1.9.1 Eukaryontische Zelllinien.....	25
2.1.9.2 Bakterienstämme.....	25
2.2 Arbeiten mit DNA.....	25
2.2.1 Restriktionsverdau	25
2.2.2 DNA- Präzipitation.....	26
2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	26
2.2.4 Agarose Gelelektrophorese.....	26
2.2.5 Ligation.....	26
2.2.6 Gewinnung von Plasmiden im analytischen Maßstab.....	26
2.2.7 Gewinnung von Plasmiden im präparativen Maßstab.....	26
2.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
2.3 Arbeiten mit Bakterien.....	27
2.3.1 Herstellen kompetenter Bakterien.....	27
2.3.2 Transformation kompetenter Bakterien.....	27
2.3.3 Glycerinkulturen von Bakterien.....	28
2.4 Arbeiten mit RNA.....	28
2.4.1 RNA Isolierung aus dendritischen Zellen.....	28
2.4.2 Konzentrationsbestimmung von RNA.....	28
2.4.3 Agarose Gelelektrophorese mit MOPS-Gelen.....	28
2.4.4 Northern Hybridisierung.....	28
2.4.4.1 Sondenherstellung.....	28
2.4.4.2 Hybridisierung	29
2.4.4.3 Exposition.....	29
2.4.5 RT-PCR.....	29

2.5. Analyse und Nachweis von Proteinen.....	29
2.5.1 Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel.....	29
2.5.2 Färben von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blau.....	29
2.6 Isolierung von Proteinen.....	29
2.6.1 Expression der Proteine in Bakterien.....	30
2.6.1.1 Zellyse.....	30
2.6.1.2 Isolation der Proteine über Nickel- Agarose (Ni-NTA).....	30
2.7. Zellkultur.....	30
2.7.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	31
2.7.2 Zellzahlbestimmung.....	31
2.8 Gewinnung von Zellen aus Buffy Coats.....	31
2.8.1 PBL Isolation	32
2.8.2 Generierung und Reifung dendritischer Zellen	32
2.8.3 Isolation von T-Zellen aus PBL durch Schafserythrozyten Rosettierung.....	32
2.9. Selektion von CD8+-Lymphozyten aus T-Zellkulturen mit Hilfe magnetischer „Dynalbeads“ (DB)	32
2.10. Antigenbeladung von von Stimulatorzellen.....	32
2.10.1 Beladung mit 9mer Peptiden.....	32
2.10.2 Beladung mit 35mer Peptiden	33
2.10.3 Transfektion von DC mit DNA und RNA mit der Amaxa- Technologie.....	33
2.11. Phänotypisierung von Zellen mittels Durchflußzytometrie.....	33
2.12. funktionelle immunologische Assays.....	33
2.12.1 Interferon- γ ELISpot.....	34
2.12.2 ^3H Proliferationsassay	34
2.12.3 CFSE-Proliferationsassay.....	34
2.13 Talon ELISA.....	35

3. Ergebnisse

3.1 „Talon ELISA“ Entwicklung einer durchflußzytometrischen Methode zum Nachweis von Antikörpern in Patientenseren.....	36
3.1.1 Klonierung der Expressionsvektoren zur Gewinnung der Proteine.	36
3.1.2 Expression und Aufreinigung der Proteine.....	36
3.1.3 Eingangsversuch zum Prinzip des Talon-ELISA.....	37
3.1.4 Optimierung der Beladung der Talon Beads mit Protein.....	38

3.1.4.1 Titration der Proteinkonzentration.....	40
3.1.4.2 Kinetik der Proteinbeladung.....	40
3.1.4.3 Mechanische Beladungsbedingungen.....	42
3.1.4.4 Beladung der Beads mit Protein aus dem Bakterienlysat.....	43
3.1.5 Test des Nachweisantikörpers anhand von Patientenseren	44
3.1.6 Optimierung der Sensitivität.....	45
3.1.7 Validierung der Methode anhand einer Serensammlung.....	47
3.1.7.1 Interassay-Korrelation.....	48
3.1.7.2 Vergleich des Talon ELISA mit den Ergebnissen der Luminex-Methode mittels κ -Analyse.....	48
3.1.8 Messen der Patientenseren	50
3.2 In vitro Experimente zur pTHampHPV16E7SH DNA Vakzine.....	52
3.2.1 Optimierung der Transfektion von dendritischen Zellen mit DNA mittels Amaza-Technologie.....	52
3.2.1.2 Ermittlung der optimalen DNA-Menge.....	52
3.2.1.3 Einfluss der zur Transfektion eingesetzten Zellzahlen auf die Transfektionseffizienz und die Viabilität der DC.....	53
3.2.2 Konstruktvalidierung.....	55
3.2.2.1 Nachweis von HPV16E7WT und –SH-Transskripten mittels Northern Blot.....	55
3.2.2.2 Nachweis der HPV16E7WT und-SH Expression mittels RT-PCR.....	56
3.2.2.3 Nachweis von HPV16E7WT und –SH Protein in den Lysaten von transfizierten DC	56
3.2.3 DC, die mit der Amaza-Technologie transfiziert werden, zeigen keine Hochregulation von Differenzierungsmarkern.....	57
3.2.3.1 Nachweis der EGFP-Expression in transfizierten DC.....	59
3.2.3.2 Phänotypisierung von transfizierten DC.....	60
3.2.3.3 Messung der IL-12 Produktion von unreif und ausgereift transfizierten DC	61
3.2.3.4 Vergleich von unreif und ausgereift transfizierten DC in der Allo-MLR.....	62
3.2.4 Restimulation von HPV16E7WT-spezifischen T-Zelllinien mit pTHampE7SH transfizierten DC.....	64
3.2.4.1 Reaktion von E7-wildtypspezifischen Linien im INF- γ ELISpot nach Restimulation mit unreif und ausgereift transfizierten DC	64
3.2.5 Aktivierung von naiven T-Zellen mit DNA transfizierten DC.....	67
3.2.5.1 Generierung der HPV16E7 35mer Peptid- und HPV16E7 pTHamp-induzierten T-Zelllinien.....	68

3.2.5.2 Phänotypisierung der Peptid- und DNA-induzierten T-Zelllinien.....	68
3.2.5.3 Spezifische Proliferation der HPV16E7 35mer Peptid- und HPV16E7pTHamp-induzierten T-Zelllinien.....	69
3.2.5.4 Spezifische Interferon- γ Sekretion der HPV16E7 35mer Peptid- und HPV16E7pTHamp-induzierten T-Zelllinien.....	70
3.2.5.5 Generierung von pTHampE7SH und –WT induzierten Linien.....	72
3.2.5.6 Phänotypisierung der pTHampE7SH und –WT induzierten T-Zelllinien.....	72
3.2.5.7 Spezifische Proliferation der pTHampE7WT und –SH induzierten T-Zelllinien im CFSE-Proliferationsassay.....	73
3.2.5.8 Spezifische Proliferation der CD4+ T-Zellen in den pTHampE7WT und –SH induzierten T-Zelllinien im 3H-Proliferationsassay.....	74
3.2.5.11 Spezifische INF- γ Freisetzung der CD8+ T-Zellen	75
3.3 In vitro Experimente mit CAP-E7SH und CAP-E7WT mRNA.....	77
3.3.1. Optimierung der Transfektion von dendritischen Zellen mit mRNA.....	77
3.3.1.1 Vergleich DNA und RNA Transfektion, sowie Lipofektion von DC.....	77
3.3.1.2 Vergleich Amaxa-Transfektion und herkömmliche Elektroporation.....	79
3.3.1.3 Effizienz der Transfektion mit zwei verschiedenen RNA-Mengen.	80
3.3.2 Restimulation von HPV16E7WT-spezifischen T-Zelllinien mit HPV16E7 CAP-RNA transfizierten DC.....	81
3.3.2.1 Vergleich des Stimulationspotentials von ausgereift und unreif RNA-transfizierten DC im INF- γ ELISpot.....	81
3.3.2.2 Vergleich des Stimulationspotentials von ausgereift und unreif RNA-transfizierten DC im CFSE-Proliferationsassay.....	83
3.3.2.3 Untersuchung des Restimulationspotentials von passiv mit RNA beladenen DC.....	86
3.3.3 Induktion von naiven T-Zellen mit CAP-E7WT und CAP–E7SH-RNA transfizierten DC.....	88
3.3.3.1 Generierung von HPV16E7 spezifischen Zelllinien mit CAP-E7WT- und CAP-E7SH-RNA.....	89
3.3.3.2 Phänotypisierung der RNA-induzierten T-Zelllinien.....	89
3.3.3.3 Spezifische Proliferation der RNA-generierten T-Zelllinien.....	90
3.3.3.4 Spezifische INF- γ Sekretion der RNA-induzierten T- Zelllinien.....	91
3.4 Restimulation von tumorinfiltrierenden Lymhozyten (TILS) aus HPV16-positiven Tumoren mit pTHampE7SH und E7SH-RNA transfizierten DC...	92

4. Diskussion

4.1. Talon ELISA.....	95
4.1.1 Etablierung der Messbedingungen.....	95
4.1.2 Statistik und Vergleich des Talon ELISA mit der Multiplexmethode nach Waterboer et al. (2005).	96
4.1.3 Beurteilung des Talon ELISA und Ausblick auf das Potential der Methode.....	97
4.2. Optimierung der Nukleofektion von DC und <i>in vitro</i> Untersuchungen zur T-Zell-Immunogenität der HPV16E7SH-Vakzine.....	97
4.2.1. Optimierung der Transfektion	97
4.2.2 Transfektion von ausgereiften DC.....	99
4.2.3. Untersuchung des T-Zell-Stimulationspotentials von ausgereift transfizierten DC.....	100
4.2.4 Spezifische funktionelle Aktivität von reif und unreif transfizierten DC als APC in immunologischen Assays-Restimulationsexperimente.....	102
4.2.5 Passive Beladung von DC mit mRNA.....	103
4.2.6 Induktion von spezifischen T-Zelllinien durch Stimulation mit reif transfizierten DC.....	104
4.2.7 Induktion einer CD4+ Antwort durch die DNA-Vakzine aber nicht in RNA-Vakzine	105
4.2.8 Restimulation von Immunantworten in E7-Wildtyp-spezifischen T-Zelllinien und tumorinfiltrierenden Lymphozyten und Induktion von E7-Wildtyp- spezifischen T-Zellantworten in naiven T-Zellen durch HPV16E7SH	107
5. Zusammenfassung.....	108

1. Einleitung

1.1 Humane Papillomviren (HPV)

Humane Papillomviren (HPV) gehören zur großen Familie der Papillomaviridae. Papillomviren werden bei nahezu allen Vertebratengruppen vorgefunden (Rowson und Mahy, 1967; O'Banion, 1987). Sie induzieren hauptsächlich primär gutartige Tumore der Haut und Schleimhäute ihrer Wirte. Zurzeit sind mehr als 100 HPV-Typen bekannt. Aufgrund der Lokalisation der Infektion in Haut oder Schleimhaut und ihres genetischen Verwandtschaftsgrades kann eine Einteilung der Typen vorgenommen werden (de Villier, 2004). Im kutanen Bereich findet man vor allem Erreger gewöhnlicher Warzen, welche sich durch starke Hyperkeratose auszeichnen. Sie entstehen vor allem an Händen, Armen und Beinen. Die Gruppe der Papillomviren beinhaltet ebenfalls Erreger von planaren Warzen, die vor allem an den Fußsohlen gefunden werden oder von flachen Warzen im Gesicht und an den Händen. Die Verursacher dieser benignen Warzen sind vor allem die HPV-Typen 1, 2, 3, 4, 7, 10, 26-29, 41, 48, 60, 63 und 65. Nur in seltenen Fällen von genetischer Prädisposition oder bei Immunsuppression können einige dieser Typen maligne Tumore auslösen. Mukosale HPV-Typen findet man zum einen im Bereich der Mundhöhle und der Larynx, wo sie leicht erhabene, multiple Papillome und epitheliale Hyperplasien auslösen. Hier sind als wichtigste Typen HPV6, 11, 13, 16, 32 und 33 zu nennen. Maligne Entartungen sind selten.

Die Papillomviren des anogenitalen Bereichs werden aufgrund ihres onkogenen Potentials in *low-risk* und *high-risk* Typen unterteilt. *Low-risk* Typen (wie HPV6, 11, 40, 42-44, 54 und 55) sind vor allem mit der Entstehung von *Condylomata acuminata* und der bowenoiden Papillomatose assoziiert.

In über 99% aller Zervixkarzinome kann HPV-DNA nachgewiesen werden (Walboomers et al., 1999). Die high-risk Typen HPV16, 18, 31 und 45 werden in über 80% dieser Tumore gefunden.

1.1.1 Epidemiologie

Das Zervixkarzinom ist weltweit die zweithäufigste Krebserkrankung der Frau. Jährlich erkranken weltweit etwa 500 000 Frauen neu am Zervixkarzinom und etwa 200 000 sterben daran, wobei 80% dieser Frauen aus Entwicklungsländern stammen (Sriamporn et al., 2005).

Der Zusammenhang zwischen einer HPV-Infektion und der Entstehung eines Zervixkarzinoms gilt inzwischen als gesichert (Dürst et al., 1983; von Knebel Doeberitz et al., 1988, 1992; Münger et al., 1989; zur Hausen et al., 1996).

Die am weitaus häufigsten gefundenen Typen sind HPV16, das für 50% der Zervixkarzinome verantwortlich gemacht werden kann, und HPV18 dessen Anteil 20% beträgt (Munoz und Bosch, 1996). Für die Entwicklung eines Zervixkarzinoms spielen weitere nicht virale Risikofaktoren eine Rolle, wie der HLA-Status, die Verwendung von oralen Kontrazeptiva, Immunsuppression, Rauchen, eine hohe Geburtenzahl (>6) frühe sexuelle Aktivität oder häufig wechselnde Geschlechtspartner (zur Hausen, 1995).

1.1.2 Struktur von HPV

Papillomviren sind kleine DNA-Viren, deren ikosaedrisches, hüllenloses Kapsid etwa 55 nm misst. Das Genom besteht aus einem kovalent geschlossenen doppelsträngigen DNA-Ring mit einer Größe von etwa 8 kb. Die DNA liegt, assoziiert mit zellulären Histonen, in einer dem Nukleosom ähnlichen Struktur als Superhelix vor. Der Genomaufbau ist für alle Papillomviren gleich. Man unterscheidet einen Bereich, der für die früh im Vermehrungszyklus gebildeten Proteine kodiert, und einen für die späten oder Strukturproteine. Alle Proteine sind auf demselben Strang kodiert. Ein nicht kodierender Bereich mit einer Größe von 1000 bp, LCR (*long control region*) genannt, enthält die Kontrollelemente für die virale und zelluläre Regulation der Genexpression, wie Enhancer und Promotoren und auch den Replikationsursprung. Die frühe Region enthält offene Leseraster für die Gene der Nicht-Strukturproteine E1, E2, E4, E5, E6 und E7 (E für *early* = früh), die in mehreren Leserastern organisiert sind. Im Bereich der späten Region sind Gene für die Strukturproteine L1 und L2 (L für *late* = spät) lokalisiert, die das Kapsid bilden. Spleiß-Donor und -Akzeptorstellen sind an verschiedenen Orten im Genom zu finden und ermöglichen die Synthese verschiedener Proteine.

1.1.3 Regulation der viralen Replikation in der Wirtszelle

Der offene Leseraster für E1 kodiert für die Proteine E1-M und E1-R. Beide haben regulatorische Funktionen bei der Replikation. Die die Replikation modulierende Form E1-M reguliert in undifferenzierten Keratinozyten die Menge der viralen Genome bis zu einer konstanten Zahl von 50-400 Kopien pro infizierte Zelle. E1-R wird erst bei der Replikation in ausdifferenzierten Epithelzellen aktiv und leitet durch die unbegrenzte Produktion von viralen Genomkopien in den infizierten Zellen den lytischen Verlauf der Infektion ein.

Innerhalb des E2 Leserasters werden die Proteine E2 und E2-Tr kodiert. Es handelt sich um DNA-bindende Proteine, die regulatorische Funktionen bei der Transkription und Replikation haben. Die wichtigste Funktion des Transaktivators E2 bei high-risk HPV-Typen ist die negative Regulation der Transkription der onkogenen E6- und E7-Proteine durch sterische Blockade der Promotorregion. Der Transrepressor E2-Tr wirkt gegensätzlich. Somit stellt das Verhältnis dieser beiden Proteine eine wichtige Regulation

für die Expression der zelltransformierenden Proteine E6 und E7 bei den high-risk HPV-Typen dar. In HPV-assoziierten malignen Läsionen kommt es bevorzugt im Bereich des E2-Leserasters zur Integration der Virus-DNA ins Wirtsgenom. Dadurch wird die Regulation der Expression von E6 und E7 aufgehoben (Dürst et al., 1995).

Über die Funktion des zytoplasmatischen E4-Proteins ist bisher wenig bekannt. Es wird eine Funktion bei der Virusfreisetzung vermutet (Doorbar et al., 1991).

Für das E5-Protein wurden vor allem bei bovinen Papillomviren starke zelltransformierende Eigenschaften beschrieben (Leechanachai et al., 1992). Auch für das E5 bei HPV16 wurde ein transformierender Charakter beschrieben (Stöppler et al., 1996).

Das E6-Protein der high-risk HPV-Typen ist stark transformierend. Es interagiert mit dem zelleigenen Tumorsuppressorprotein p53 und führt es dem ubiquitinabhängigen Abbau zu. Der daraus resultierende Mangel an p53 führt zu einer Verkürzung der G₁-Phase der infizierten Zelle. Durch den verfrühten Eintritt in die S-Phase werden die DNA-Reparaturmechanismen behindert und es kommt zu einer vermehrten Anhäufung von Mutationen. Die Einleitung der Apoptose bei irreparablen DNA-Schäden wird ebenfalls verhindert. Dem E6-Protein wird eine weitere für die Zelltransformation wichtige Funktion zugeschrieben. Es aktiviert die zelluläre Telomerase und wirkt damit der Zellalterung durch Verkürzung der Telomeren entgegen. Für eine effiziente Immortalisierung der Zelle ist neben dem E6-Protein aber auch E7 notwendig (Munger et al., 1989).

Die Wirkung des E7-Proteins ist der Hauptfaktor für das transformierende Potential von high-risk HPV. Das Protein enthält drei konservierte Abschnitte die als CR 1-3 (*conserved region*) bezeichnet werden. Die sogenannte CR 2 ist in der Lage das zelleigene Tumorsuppressorprotein pRB (Retinoblastomprotein) zu binden und damit zu inaktivieren. Das pRB-Protein hat die Aufgabe, den zellulären Transaktivator E2F zu inaktivieren und damit die Transkription der durch ihn gesteuerten Gene zu unterbinden. Durch die Bindung des E7-Proteins an pRb kommt es zur Freisetzung von E2F. Dadurch wird die Regulation der Zellteilung aufgehoben. Bei den CR 1 und CR 3-Regionen handelt es sich um Zinkfinger motive (Cys-X-X-Cys), die Bedeutung für die Proteinstabilität und die E7-Dimerisierung haben (zur Übersicht: zur Hausen, 2001).

1.1.4 Virusreplikation und Infektionszyklus

Papillomviren infizieren die teilungsaktiven undifferenzierten Zellen des *Stratum basale* der Haut und der Schleimhaut, wohin die Viren wahrscheinlich durch kleine Verletzungen in der Haut oder Schleimhaut gelangen. Die Aufnahme des Virus erfolgt durch rezeptorvermittelte Endozytose. Als beteiligte Rezeptoren werden der $\alpha 6$ -Integrinrezeptor

(Müller et al., 1995) und FcγRIII (CD16) (Evander et al., 1997) beschrieben. Das virale Genom liegt episomal in einer Kopiezahl von 50-100 vor (Dürst et al., 1995). Hier kommt es zu einer Expression der frühen viralen Gene E1, E2, E6 und E7, wodurch die Zellteilung stimuliert wird. Bei der Zellteilung wird die Virus-DNA auf die beiden Tochterzellen verteilt. Eine dieser Zellen verbleibt als Stammzelle im *Stratum basale*, die andere wandert ins *Stratum spinosum*, wo die Zelldifferenzierung einsetzt. Die Expression der viralen Gene ist abhängig vom Differenzierungsgrad der infizierten Zelle. Während im *Stratum basale* und *Stratum spinosum* nur wenige Virusgenome vorhanden sind, nimmt ihre Zahl mit dem Einwandern der infizierten Zelle ins *Stratum granulosum* erheblich zu. Zusätzlich kommt es zur Expression der späten Gene L1 und L2 und damit zur Bildung von Viruspartikeln. In der obersten Hautschicht, dem Stratum corneum wird eine große Anzahl von Viruspartikeln produziert. Nach Absterben der Keratinozyten werden die Partikel durch Abschleifung freigesetzt. Durch das Verbleiben der infizierten Stammzellen im *Stratum basale* entstehen fortwährend neue infizierte Zellen, so dass die Entstehung einer persistierenden HPV-Infektion möglich ist (zur Übersicht siehe zur Hausen (2002).

Das Zervixkarzinom entsteht aus histologisch definierten prämaligen Läsionen, den zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN). Es werden aufgrund des Schweregrades drei Stufen unterschieden (CIN I-III), die in der Entstehung eines invasiven Karzinoms münden können. 2% der persistent mit high-risk HPV infizierten Frauen entwickeln ein Karzinom (zur Hausen, 1991). In einer Meta-Analyse, die 3529 Frauen mit CIN I einbezog, fand Ostor 1993 bei 57% der Patientinnen eine spontane Regression. Bei 32% persistierte die Infektion, bei 11% kam es zur Progression zur CIN III und 1% der Frauen entwickelte ein Karzinom. Koutsky et al. (1992) untersuchten 241 Frauen, die zu Beginn der Studie zytologisch unauffällig waren. Im Verlauf der Untersuchung entwickelten 28% der Frauen, die positiv auf HPV getestet wurden zervikale intraepitheliale Neoplasien. In allen Fällen traten diese Läsionen innerhalb von 24 Monaten nach dem ersten positiven HPV-Test auf.

1.2. Rolle des Immunsystems bei der Kontrolle von HPV-Infektionen

In Abschnitt 1.1.3 wurde bereits erwähnt, dass Immundefizienz zu einem gesteigerten Risiko für persistierende HPV-Infektionen und die Entstehung von HPV-induzierten malignen Erkrankungen führt. Das konnte z. B. bei HIV-Infizierten und AIDS-Patienten (Maiman et al., 1990; Ho et al., 1994) sowie immunsupprimierten Transplantationspatienten (Shamanin et al., 1994; Halpert et al., 1986) gezeigt werden. Dies weist auf die wichtige Rolle des zellulären Immunsystems bei der Kontrolle und der Eliminierung von HPV-Infektionen hin.

Die natürliche Immunantwort gegen HPV ist nur schwach ausgeprägt, was sich durch die schlechte Zugänglichkeit der infizierten Epithelzellen für die Zellen des Immunsystems erklärt (Stanley et al., 2006). Bei intakter Basallamina sind die höher differenzierten Epithelzellen, in denen die Antigenproduktion stattfindet, für die Monozyten und Lymphozyten schwer zu erreichen. Allerdings konnten in regredierendem Warzengewebe von Coleman et al. (1994) infiltrierende Makrophagen sowie $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen werden.

Bei Zervixkarzinompatientinnen geht man davon aus, dass es nicht zu einer ausreichenden Aktivierung der zellulären Immunantwort kommt. Dafür werden verschiedene Gründe diskutiert. Tumorzellen sind in der Lage, Zytokine wie beispielsweise IL-10 oder TGF- β zu sezernieren, die einen inhibitorischen Effekt auf T-Zellen haben. Die epithelialen Tumorzellen exprimieren häufig keine oder nur sehr geringe Mengen costimulatorischer Signale, wodurch es zu Anergieeffekten bei T-Zellen kommen kann. Eine stattfindende zelluläre Immunantwort setzt den Tumor zudem unter einen Selektionsdruck, der letztlich in späten Stadien zu HLA-Verlusten führen kann.

1.2.1 zelluläre Immunantwort

Man unterscheidet beim Menschen zwischen dem angeborenen und dem erworbenen oder adaptiven Immunsystem. Zum angeborenen Immunsystem werden Mechanismen gezählt, die eine erste schnelle Reaktion auf vor allem bakterielle Infektionen oder in den Körper eindringende Fremdkörper auslösen. Dazu zählt man zum Beispiel das Komplementsystem und die verschiedenen Phagozyten, die unter anderem rezeptorvermittelt allgemein vorkommende Bakterien phagozytieren und in aktiviertem Zustand Zytokine sezernieren. Diese lösen entzündliche Reaktionen aus, bzw. locken Zellen der adaptiven Immunantwort an. Das angeborene und das erworbene Immunsystem sind über verschiedene Mechanismen miteinander verzahnt. Die adaptive Immunantwort stellt die Reaktion antigenspezifischer Lymphozyten gegen „ihr“ Antigen dar. Man unterscheidet zwei Typen, die B- und T-Lymphozyten. Die B-Lymphozyten sind für die humorale Immunantwort verantwortlich (siehe Abschnitt 1.2.2).

Bei den T-Lymphozyten, die vor allem in der zellulären Immunantwort eine wichtige Rolle spielen, unterscheidet man auf Grund der Expression ihrer Korezeptor-Proteine zwischen $CD4$ -positiven ($CD4^+$) und $CD8$ -positiven ($CD8^+$) T-Zellen. Die $CD4^+$ T-Zellen erkennen Peptide die von DC extrazellulär aufgenommen wurden und im Zusammenhang mit MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden. Sie werden auch als T-Helfer-Zellen (T_H) bezeichnet. Die Effektorzellen differenzieren in verschiedene Gruppen. Die zwei Hauptgruppen stellen die T_{H1} - und T_{H2} -Zellen dar. Die T_H -Zellen produzieren Zytokine,

die bei der Aktivierung von B-Zellen und Makrophagen eine Rolle spielen. Damit vermitteln sie zwischen der zellulären und der humoralen Immunantwort.

Die für die Eliminierung von transformierten Zellen besonders wichtigen Effektorzellen der zellulären Immunantwort sind die CD8⁺ oder cytotoxischen T-Zellen (CTL). Der CD8-Korezeptor dieser Lymphozyten bindet bei der Antigenerkennung an den MHC-I-Komplex der antigenpräsentierenden Zelle. Auf MHC-I gebundene Epitope sind Prozessierungsprodukte von im Zytosol vorgefundenen Proteinen. Dieser Aktivierungsweg ist somit besonders wichtig für die Eliminierung von intrazellulären Infektionen, z. B. durch Viren. Für HPV16E7 sind bisher drei CTL-Epitope bekannt. Es handelt sich um die Peptide E7₁₁₋₂₀, E7₈₂₋₉₀ und E7₈₆₋₉₃. Für HPV18 ist ein HLA-A*0201 restringiertes Epitop bekannt (Kather et al., 2003).

Das zelluläre Immunsystem spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Eliminierung einer HPV-Infektion und HPV-assoziierten Neoplasien. Dafür spricht die schon erwähnte höhere Inzidenz von HPV-assoziierten Läsionen in immunsupprimierten Personen. Coleman et al. gelang es 1994 zum ersten Mal, in spontan regredierenden Warzen infiltrierende CD4⁺ und CD8⁺ Zellen nachzuweisen. In vitro (Torrens et al., 2005) und im Tiermodell (Eiben et al., 2002, Zwaveling, 2002) konnte mehrfach nachgewiesen werden, dass die Immunisierung mit den HPV-Antigenen E6 und E7 zu einer Regression bestehender Tumoren, bzw. zur Protektion vor Tumoren führen kann. Auch in Patientinnen konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung einen positiven Einfluss auf den Verlauf von persistierenden HPV-Infektionen und HPV-assoziierten Läsionen haben kann (Hallez et al., 2004, Vambutas et al., 2005).

1.2.2 humorale Immunantwort

Ziel der humoralen Immunantwort ist es, Krankheitserreger, die sich in den extrazellulären Bereichen befinden, zu eliminieren. Die Effektorzellen sind aktivierte B-Zellen, die nach Aktivierung durch T-Zellen der TH₂-Gruppe zu Antikörper bildenden Plasmazellen differenzieren. Die gebildeten Antikörper haben drei Funktionen im Immunsystem. i) Sie neutralisieren intrazelluläre Erreger wie Viren oder bestimmte Bakterien, indem sie die für deren rezeptorvermittelte Aufnahme notwendigen Strukturen blockieren. ii) Bakterielle Pathogene werden mit Hilfe von Antikörpern durch die so genannte Opsonierung eliminiert. Die an die Oberfläche der Pathogene gebundenen Antikörper werden von den Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche von phagozytierenden Zellen gebunden. Diese Bindung verstärkt die Phagozytose. iii) Darüber hinaus spielen Antikörper eine Rolle bei der Komplementaktivierung.

Bei Infektionen mit high risk HPV-Typen werden vor allem Antikörper gegen das virale Kapsidprotein L1 gefunden, sowie gegen die viralen Onkogene E6 und E7. Kirnbauer et al. (1993) fanden spezifische Antikörper gegen das HPV16L1 Protein bei 59% der Frauen, deren Zervixabstrich positiv auf HPV16 DNA getestet worden war. Nur bei 6% der HPV16 DNA negativen Frauen konnten sie spezifische Antikörper gegen L1 nachweisen. Die gegen das L1 Protein gefundenen Antikörper sind typspezifisch (Dillner, 1999; Kjellberg et al., 1999). Eine Ausnahme stellen hierbei die low risk Typen dar, die gemeinsame Epitope im Kapsidbereich aufweisen (Christensen et al. 1994; 1996).

Antikörper gegen die Onkoproteine E6 und E7 gelten als Marker für maligne HPV assoziierte Erkrankungen (Nindl, et al., 1994; Dillner et al. 1995; Meschede et al., 1998; Zumbach, et al, 2000). Sie sind ebenfalls stark typenspezifisch (Zumbach et al., 2000). In dieser Arbeit wurden die Seren von 95 Patientinnen mit Zervixkarzinom, die positiv auf HPV16 oder 18 DNA getestet worden waren, untersucht. Sie fanden, dass 36% der Karzinompatientinnen eine serologische Reaktion auf E6 und/oder E7 zeigten. In einer Kontrollgruppe mit nicht HPV assoziierten Tumoren waren nur 2% seropositiv. Dabei konnten sie ebenfalls zeigen, dass die Stärke der Antikörperreaktion gegen E6 und E7 mit höherem Krankheitsgrad zunahm (21% seropositive in Figo I, 42% in Figo II und 53% in Figo III).

Die übliche Nachweismethode für die serologischen Antworten auf HPV-Antigene ist der ELISA. Die Arbeitsgruppe um Pawlita veröffentlichte 2005 (Waterboer et al.) eine auf Durchflußzytometrie basierende Multiplexmethode.

1.2.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) gelten als die effizientesten professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) des Immunsystems (Steinmann, 1991). Sie exprimieren auf ihrer Oberfläche sehr viele MHC-Klasse-I und -II-Moleküle, sowie kostimulatorische Signalmoleküle.

Die MHC-I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert, während der MHC-II-Komplex hauptsächlich auf APC gefunden wird. Die Aufgabe der DC ist es, Antigene aus ihrer Umgebung aufzunehmen und sie den naiven T-Zellen zu präsentieren. DC treten in allen Geweben und Organen auf, mit Ausnahme des Gehirns, der Testis und Teilen des Auges. Im nicht lymphatischen Gewebe findet man sie als Langerhans Zellen in der Haut, den Schleimhäuten und in der Lunge. Aufgrund ihres Auftretens im Körper unterscheidet man interstitielle DC im Bereich der Interstitialräume der Organe, Blut-, lymphatische oder interdigitierende DC.

DC entwickeln sich aus verschiedenen Vorläuferzellen. Man unterscheidet Vorläuferzellen

myeloiden, lymphoiden und hämatopoetischen Ursprungs. Aus den myeloiden CD34-positiven Vorläuferzellen entwickeln sich epidermale Langerhanszellen sowie interstitielle DC. Die in dieser Arbeit besonders interessierenden DC sind die von humanen peripheren Blutmonozyten abstammenden DC. Ihre Vorläufer zeichnen sich durch die Expression von CD14 an der Zelloberfläche aus. Die Vorläuferzellen haben je nach Zytokinmilieu die Fähigkeit sich zu Makrophagen oder DC zu entwickeln. Unter Einfluss von M-CSF entstehen CD14⁺ Makrophagen, während GM-CSF und TNF- α die Entwicklung zu CD14-DC fördern. In *in vitro* Kulturen werden GM-CSF und IL-4 eingesetzt, um die Entwicklung der Vorläuferzellen in Richtung der DC zu lenken (Romani et al., 1994).

DC weisen zwei verschiedene Entwicklungsstadien auf, die durch unterschiedliche Funktionen und unterschiedliche Genexpression gekennzeichnet sind. Phänotypisch können sie durch das Vorhandensein oder Fehlen verschiedener Reifungsmarker an der Zelloberfläche unterschieden werden. Dabei handelt es sich um die zur T-Zellaktivierung notwendigen kostimulatorischen Moleküle, wie CD80 oder CD86 oder auch um Adhäsionsmoleküle wie CD54 (ICAM-1) oder CD58 (LFA-3). Die Expression von MHC-I und -II-Molekülen auf der Oberfläche von reifen DC ist stark erhöht.

Unreifen DC wird die Aufgabe zugeschrieben, über das Blut in die peripheren Gewebe einzuwandern und dort die Antigene in ihrer Umgebung aufzunehmen. Dies geschieht über Makropinozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose. Zur Auslösung des Reifungsvorgangs und der zur Aktivierung der Migration zu den lymphatischen Zielgeweben ist ein zusätzliches Signal aus der Umgebung notwendig. Dies kann durch inflammatorische Zytokine oder mikrobielle Antigene wie beispielsweise LPS gegeben werden. Während der Migration zu den lymphatischen Organen erfolgt die Reifung der DC die zu phänotypischen und funktionellen Veränderungen führt, die reife DC zu effektiven Stimulatoren der Immunantwort macht.

Aufgrund ihrer Fähigkeit, effektiv Immunantworten in naiven T-Zellen auszulösen oder zu restimulieren, sind DC besonders geeignet, um sie in *in vitro* Untersuchungen einzusetzen.

1.3 HPV-Vakzine

Man kann grundsätzlich zwischen zwei Arten der Vakzinierung unterscheiden, die prophylaktische und die therapeutische. Prophylaktische Impfungen sollen bereits vor dem Kontakt mit einem Erreger einen Schutz gegen die Infektion aufbauen. Solche Impfstoffe gibt es für zahlreiche Krankheitserreger wie Masern, Mumps, Röteln oder Hepatitis B.

1.3.1 prophylaktische Vakzine

Erst seit Juni 2006 ist ein prophylaktischer Impfstoff gegen HPV in den USA kommerziell erhältlich. Ein weiterer wird voraussichtlich Anfang 2007 zugelassen. Beide Impfstoffe basieren auf dem Prinzip der *virus-like-particles*, die aus dem Kapsidprotein L1 von HPV16/18 und den low risk-HPV-Typen 6 und 11 bestehen (Koutsky et al., 2002, Harper et al., 2004; 2006, Villa et al., 2005). Solche prophylaktischen Vakzinierungen lösen die Ausbildung von neutralisierenden Serumantikörpern aus, die bei späterem Kontakt mit dem Virus eine Infektion verhindern. Einen therapeutischen Effekt haben diese Vakzine nicht.

1.3.2 therapeutische Vakzine

Eine therapeutische Vakzinierung richtet sich an bereits infizierte Patienten. Das Ziel ist, eine spezifische zellvermittelte Immunität zu induzieren, um bei HPV-Infektionen die Ausbildung von Dysplasien zu verhindern, bzw. bereits vorhandene prä-maligne oder maligne Läsionen zur Regression zu bringen. In HPV-assoziierten Tumoren sind die viralen Onkoproteine E6 und E7 konstitutiv exprimiert (von Knebel-Döberitz et al., 1988, 1992). Diese virusspezifischen Proteine sind damit ideale Angriffspunkte für die Entwicklung einer therapeutischen Vakzinierung. In den vergangenen Jahren ist eine Vielzahl von Ansätzen in präklinischen Untersuchungen und klinischen Studien erprobt worden (zur Übersicht: Kaufmann et al., 2002, Schreckenberger und Kaufmann, 2004; Gilboa und Vieweg, 2004). Im Mausmodell und in *in vitro* Untersuchungen waren Vakzinierungen mit synthetischen MHC-restringierten CTL-Epitopen durchaus erfolgreich (Feltkamp et al., 1993). In klinischen Studien konnte allerdings nur ein bescheidener Erfolg gefunden werden, da diese Vakzine die Initiation der T-Helferantwort nicht unterstützen. Die Arbeitsgruppe von van der Burg in Leiden arbeitet derzeit an einer Vakzinierungsstrategie mit überlappenden 35mer Peptiden von E7, die auch T-Helferepitope enthalten (van der Burg et al., 2001, Zwaveling et al., 2002). Vakzine auf der Basis von viralen Vektorsystemen wurden beispielsweise von Corona Guterrez et al. (2004) entwickelt. In einer Phase I/II Studie wurde ein modifizierter MVA-E2 Vacciniavirus eingesetzt. Die Arbeitsgruppe um Gilboa setzt mRNA transfizierte DC zur Vakzinierung von Patienten mit Prostata- und Nierenkarzinomen ein (Heiser et al 2000, Roudier et al., 2003). Die in dieser Arbeit im Humansystem bearbeitete, rearrangierte (geschuffelte) HPV16E7-Vakzine ist ein neuartiger Ansatz auf diesem Gebiet (siehe Abschn.1.3.2).

1.3.2 Vakzinierung mit einer rearrangierten HPV16E7 DNA-Vakzine

Das Auslösen einer spezifischen zellulären Immunantwort gegen das in den Zervixkarzinomzellen konstitutiv exprimierte E7-Protein stellt, wie bereits erwähnt, eine

vielversprechende Strategie für die Immuntherapie dar.

In der Arbeitsgruppe von L. Gissmann (Angewandte Tumorimmunologie, DKFZ, Heidelberg) wurde eine auf DNA basierende Vakzine nach der Strategie des so genannten „*gene shuffling*“ entwickelt.

Da das E7-Protein, wie in Abschnitt 1.1.4 beschrieben, über onkogene Eigenschaften verfügt, ist die Immunisierung mit seinem nativen Gen nicht möglich, da das Risiko von *de novo* Tumorinduktion durch onkogene inserierte DNA gegeben sein könnte. Die Arbeitsgruppe stellte die Hypothese auf, dass ein rearrangiertes oder geschuffeltes Onkogen keine transformierenden Eigenschaften mehr aufweisen würde. Das HPV16E7-Gen wurde in vier Abschnitte geteilt, die in anderer Reihenfolge arrangiert wurden (Abb. 1.1). Um den Verlust von potentiellen Epitopen im Bereich der Schnittstellen zu vermeiden, wurde dem Gen ein Appendix angehängt, der diese drei Übergangsbereiche beinhaltet. Zur rechten und linken jeder Schnittstelle wurden je 27 Basen angefügt, was auf Proteinebene 9 Aminosäuren und damit der Länge eines 9mer CTL-Epitops entsprechen sollte. In einer *Proof-of-Principle*-Studie (Osen et al., 2001) wurde dieses artifizielle Gen zur Steigerung der Immunogenität mit dem VP22-Gen von Herpes-simplex Typ 1 fusioniert. Osen et al. konnten zeigen, dass dieses Konstrukt im Agar-Transformationsassay in einer transfizierten Mausfibroblasten-Zelllinie keine Foci-Bildung zeigte. Daraus wurde gefolgert, dass die rearrangierte Variante des HPV16E7-Gens im Gegensatz zur Wildtypvariante nicht mehr zelltransformierend wirkt. In Chrom-Freisetzung-Zytotoxizitätsassays wurden nach Immunisierung von C57/BL6 Mäusen mit dem geschuffelten HPV16E7-Gen E7-spezifische zytolytische T-Zellen gefunden (Öhlschläger, et al., 2006).

Im Rahmen einer Dissertation wurde eine als „zweite Generation“ bezeichnete geschuffelte Variante des E7-Gens, dass, in Hinblick auf eine klinische Anwendung, zusätzliche Sicherheitsmerkmale aufweisen sollte, entwickelt (Öhlschläger et al. 2006). Wie in Abbildung 1.1 dargestellt, wurde das E7-Gen an den für die zelltransformierenden Eigenschaften relevanten Stellen geschnitten. Im „Core“-Element, nicht jedoch im „Appendix“ wurde eine Kodon-Optimierung für das humane System durchgeführt. Damit sollte das Risiko herabgesetzt werden, durch intramolekulare Rekombinationsereignisse die Wildtypform des Gens entstehen zu lassen. Eine Steigerung der Immunogenität sollte diesmal durch die Fusion des Genes mit der so genannten Kozak-Sequenz erfolgen, die eine Steigerung der Translationsrate des Gens bewirkt (Kozak, et al., 1991). Die Klonierung des Gens erfolgte in den Vektor pTHamp, der in seiner Version ohne Antibiotikaresistenzen eine Zulassung zur Anwendung als Immunisierungsvektor in der Klinik hat (Hanke et al., 1998, 2000).

Es gelang zu zeigen, dass dieses HPV16E7SH DNA-Vakzine im Soft-Agar-Transformationsassay im Gegensatz zu der Wildtypvariante dieses Gens keine zelltransformierenden Eigenschaften zeigt. In Mausexperimenten gelang es, das Vorhandensein zytolytischer T-Zellen nach Immunisierung mit der DNA-Vakzine zu beweisen. Es war ebenfalls möglich, im Mausexperiment Tumorprotektion und auch Tumorregression nach Immunisierung mit dieser DNA-Vakzine zu zeigen (Öhlschläger et al., 2006).

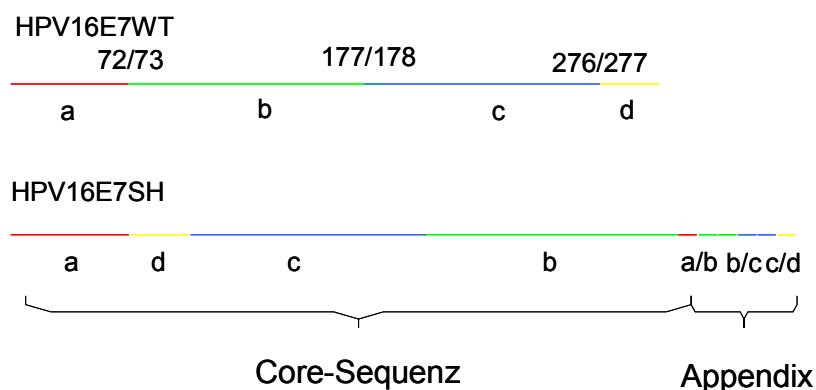


Abb.1.1: Schematische Darstellung des Aufbaus der HPV16E7SH Vakzine

1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit - In vitro Untersuchungen zur Immunogenität einer HPV16E7 DNA-Vakzine im humanen System

In der vorliegenden Arbeit soll die Immunogenität einer rearrangierten DNA-basierenden HPV16E7 Vakzine im humanen System untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde ein *in vitro* System entwickelt, dass die Etablierung spezifischer T-Zelllinien mit Hilfe von HPV16E7SH-DNA und der davon synthetisch hergestellten RNA transfizierten DC ermöglicht.

1.4.1 Methodenentwicklung

Zur Verlaufskontrolle in Immunisierungsstudien ist die Kontrolle der Bildung von antigenspezifischen Antikörpern interessant. Die zur Verfügung stehenden Methoden sind der ELISA oder eine im Labor von Michael Pawlita (DKFZ Heidelberg) neu entwickelte auf dem Luminexprinzip basierende durchflußzytometrische Methode (Waterboer et al., 2006). In dieser Arbeit soll eine Methode etabliert werden, die eine schnelle Anpassung an eine große Bandbreite von Antikörpern bzw. Antigenen ermöglicht. Sie basiert auf der Verwendung paramagnetischer Partikel (Talon Beads), die in der Lage sind, über eine Kobalt-Komplexbindung eine Affinitätsbindung zu His-getaggtten Proteinen herzustellen. Aus den zu untersuchenden Seren sollen damit für dieses Protein spezifische Antikörper herausgefangen werden, und mittels fluoreszenzmarkierter Sekundärreagenzien

(Streptavidin) im Durchflußzytometer detektiert werden. Zur Etablierung der Methode stand eine Serensammlung zur Verfügung, die auch schon bei der Etablierung der oben erwähnten Luminexmethode zum Einsatz kam, sodass ein direkter Vergleich der Methoden möglich war.

Zu Beginn dieser Arbeit stand kein System zur Verfügung, dass die effektive Transfektion von DC mit DNA ermöglichte. Da dendritische Zellen nicht teilungsaktiv sind, kann mit den herkömmlichen Transfektionsmethoden, wie Lipofektion oder Elektroporation, die die DNA ins Zytoplasma transportieren, keine effiziente Antigenbildung in den Zellen erreicht werden. Ein kommerziell erhältliches System (Nucleofector und Dendritic Cell Nucleofector Kit der Firma Amaxa, Köln) erlaubt den direkten Transfer in den Nukleus. Aufbauend auf diesem System wurde eine Methode entwickelt, welche die Herstellung von funktionsfähigen antigenpräsentierenden dendritischen Zellen möglich machte.

1.4.2 Bestimmung der Immunogenität der Vakzine *in vitro*

Das Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der in Abschnitt 1.3.2 beschriebenen auf dem HPV16E7 basierenden „geschuffelten“ DNA-Vakzine in einem humanen *in vitro* System. Parallel sollte die Immunogenität dieses Konstrukts auf RNA-Basis überprüft werden. DNA- bzw. RNA transfizierte DC wurden als APC zur Stimulation/Restimulation von T-Zellen eingesetzt.

Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- wird das transfizierte Gen in den dendritischen Zellen transkribiert und das Protein gebildet
- können mit dem „geschuffelten“ Gen von HPV16E7 und der korrespondierenden RNA transfizierte dendritische Zellen wildtypspezifische T-Zellen restimulieren und auch *de novo* eine Immunantwort auslösen
- kann mit dieser Vakzine in einer humanen T-Zellkultur eine Immunantwort ausgelöst werden, die sich gegen bekannte HPV16E7-CTL-Epitope richtet

1.4.3 Bestimmung der Immunogenität *ex vivo* in tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL)

Mit Hilfe von aus Zervixkarzinomen von HPV16 positiven Patientinnenl gewonnenen TIL sollte gezeigt werden, dass die im artifiziellen System der *in vitro* Analysen gefundenen Immunantworten auch tatsächlich relevante Ergebnisse darstellen. Da das E7-Protein in Zervixkarzinomzellen konstitutiv exprimiert wird, sollte es möglich sein, in einigen der TIL-

Proben mit Hilfe von HPV16E7SH transfizierten DC eine Immunantwort zu restimulieren.

Die Seren der Patientinnen, deren TIL in den immunologischen Assays untersucht wurde, kamen auch zur Überprüfung der fluoreszenzzytometrischen Methode zur Antikörperbestimmung zum Einsatz.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Geräteliste: s. Anhang A

2.1.2 Verbrauchsmaterial: s. Anhang B

2.1.3 Chemikalien: s. Anhang C

2.1.4 Kulturmedien und Antibiotika

2.1.4.1 für eukaryontische Zellen

Tab. 2.1.2: Kulturmedien für eukariotische Zellen

Kulturmedium	Bezugsquelle
RPMI-1640 mit Glutamax II	Invitrogen (Paisley, Schottland, UK)
DMEM	Invitrogen (Paisley, Schottland, UK)
AIM-V	Invitrogen (Paisley, Schottland, UK)
CellGro	CellGenix (Freiburg)

2.1.4.2 für Bakterien

Luria-Broth-Medium (LB): 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 5 g/l NaCl pH7

2.1.4.3 Antibiotika

Ampicillin (Roth, Karlsruhe): Endkonzentration 100 µg/ml

Kanamycin (Roth, Karlsruhe): Endkonzentration 25 µg/ml

2.1.5 Zytokine

Tab. 2.1.2: Zytokine

Zytokin	Bezugsquelle
rHu IL-1β	R&D System (Wiesbaden)
rHu IL-2	Promocell (Heidelberg)
rHu IL-4	Immunotools (Friesoythe)
rHu IL-6	R&D System (Wiesbaden)
rHu IL-7	Promocell (Heidelberg)
GM-CSF	Promocell (Heidelberg)
Leukine	Berlex (Richmond, Ca, USA)
TNF α	PAN Biotech (Aidenbach)
Prostaglandin E ₂	Pharmacia & Upjohn GmbH (Erlangen)

2.1.6 Antikörper

2.1.6.3 Antikörper für die Durchflußzytometrie

Tabelle 2.1: Antikörper für die Durchflußzytometrie:

Antikörper	Isotyp	Fluorochrom	Klon	Hersteller	End-Verd. ^c
<u>Erstantikörper</u>					
CD3	Maus IgG1,κ	FITC ^a	B-B11	DIACLONE (Besancon Cedex, Frankreich)	1:25
CD4	Maus IgG1,κ	APC	RPA-T4	BD Bioscience (San Diego, Ca, USA)	1:100
CD4	Maus IgG1,κ	PE ^b	B-F5	DIACLONE (Besancon Cedex, Frankreich)	1:50
Antikörper	Isotyp	Fluorochrom	Klon	Hersteller	End-Verd. ^c
CD8	Maus IgG1	PE ^b	B-H7	DIACLONE (Besancon Cedex, Frankreich)	1:50
CD14	Maus IgG2a,κ	APC	M5E2	BD Bioscience (San Diego, Ca, USA)	1:20
CD19	Maus IgG1,κ	APC	HIB19	BD Bioscience (San Diego, Ca, USA)	
CD25	Maus IgG1,κ	FITC ^a	M-A251	BD Bioscience (San Diego, Ca, USA)	1:50
CD56	Maus IgG1, κ	APC	B159	PharMingen (San Diego, USA)	1:25
CD83	Maus IgG1, κ	PE	HB15e	BD Bioscience (San Diego, Ca, USA)	1:100
CD86	Maus IgG1, κ	Cy ⁵	2331 (FUN-1)	BD Bioscience (San Diego, Ca, USA)	1:50
HLA-A2	Maus IgG2b		HB82	Hybridom-Kulturüberstand im Labor hergestellt	1:2
MHC-Klasse-II HLA-DR, DP, DQ	Maus IgG2a, κ	FITC	Tü39	BD Bioscience (San Diego, Ca, USA)	1:100
<u>Zweitantikörper</u>					
<u>Isotypkontrollen</u>					
	Maus IgG1, κ	FITC ^a	X40	BD Bioscience (San Diego, Ca, USA)	1:25
	Maus IgG1, κ	PE ^b	X40	BD Bioscience (San Diego, Ca, USA)	1:25
Maus IgG+Maus IgM	Ziege	F(ab') ₂ -FITC ^a	polyklonal	JacksonImmunoResearch (West Grove, USA)	1:100
	Maus IgG1, κ	Cy	X40	BD Bioscience (San Diego, Ca, USA)	1:25
	Maus IgG1, κ	APC	X40	BD Bioscience (San Diego, Ca, USA)	1:25
	Maus IgG2a, κ	PE	X39	BD Bioscience (San Diego, Ca, USA)	1:25

2.1.6.2 Antikörper für INF-γ ELISpot

α-human-IFN-γ, Klon 1-D1K

Mabtech (Upsala, Schweden)

α-human-IFN-γ, Klon 7-B6-1 (biotinyliert)

Mabtech (Upsala, Schweden)

2.1.6.3 Antikörper für Western Blot

Ziege α-HPV16E7 Antiserum

Dr. Werner Zwerschke (Innsbruck, Österreich)

Kaninchen α-Ziege IgG, HRP konjugiert

Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)

2.1.6.3 Antikörper und Nachweisreagenz für Talon ELISA

Biotin-SP-conjugated Goat anti-human

IgA+IgG+IgM (H+L)

Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)

Streptavidin, R-Phycoerythin Konjugat

Mo Bi Tec (Göttingen)

NM2 Maus α-HPV16E7 AK (monoklon.)

Dr. N. Michels (DKFZ, Heidelberg)

Ziege α-Maus, PE konjugiert (polyklon.)

Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)

2.1.7 Peptide

Tabelle 2.2: Zur Induktion und Analyse spezifischer T-Lymphozyten verwendete Peptide bzw. Peptidpools

Peptide	Sequenz	Herkunft	Restriktion	Bezugsquelle
BMLF-1 280-288	GLCTLVAML	EBV	HLA-A*0201	DKFZ (Heidelberg)
16-E7 11-20	YMLDLQPETT	HPV16	HLA-A*0201	DKFZ (Heidelberg)
16-E7 82-90	LLMGTTLGIV	HPV16	HLA-A*0201	DKFZ (Heidelberg)
16-E7 86-93	TLGIVCPI	HPV16	HLA-A*0201	DKFZ (Heidelberg)
Peptide	Sequenz	Herkunft	Restriktion	Bezugsquelle
16-E6 29-38	TIHDIILECV	HPV16	HLA-A*0201	DKFZ (Heidelberg)
16-E7-35mere	Peptidbibliothek	HPV16		PolyPeptide Laboratories (Wolfenbüttel)

2.1.8 Enzyme, Oligonukleotide, Kits, Plasmide, RNA

2.1.8.1 Enzyme

Platinum Pfx DNA Polymerase	Invitrogen (Paisley, Schottland, UK)
AmpliTaQ Gold Applied Biosystems	(Foster City, Canada)
DNase Roche Diagnostics (Mannheim)	
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Schwalbach)
RNase (DNase frei)	Sigma (Deisenhofen)
T4-Ligase	Boehringer (Mannheim)

2.1.8.2 Oligonukleotide

Tabelle 2.3: Primersequenzen:

Primer	Sequenz
HPV16E7SH Klonierung	antisense: 5'CGGGATCCCACGGCGACACCCCCACC 3' sense: 5'CCCAAGCTT TTATGGTTTCTGAGAACA 3'
HPV16E7WT Klonierung	antisense: wie HPV16E7SH sense: CCCAAGCTT TTAGGGTTTCTGGCTGCA
pQE9 Sequenzierung 5'Ende IRD 800 markiert	antisense: GGTCATTACTGGAGTCTTG sense: CCCGAAAAGTGCCACCTG
RT-PCR	AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TAG CAG CT

Alle Primer wurden von der Firma Thermo (Ulm) bezogen.

Die Klonierungsprimer wurden mit den Restriktionsschnittstellen für BamHI und HindIII versehen. Diese Primer wurden auch als spezifische Primer für die RT-PCR eingesetzt. Sequenzierungsprimer wurden dem Qiagen Handbuch entnommen.

2.1.8.3 Kits

QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Plasmid Maxi Kit (Nucleobond AX500)	Macherey and Nagel (Düren)
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Human Dendritic Cell Nucleofector™ Kit	Amara Biosystems (Köln)

2.1.8.4 Plasmide

pTHampHPV16E7SH Co Aa und pTHampHPV16E7Wto

Diese Vektoren wurden zur Transfektion von DC eingesetzt. Das ist

Die Vektoren pTHampHPV16E7SH und pTHampHPV16E7WT wurden von Dr. Peter Öhlschläger im Rahmen seiner Promotion erstellt (Öhlschläger et. 2006) und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

HPV18E7 pET29a

Das Proteins HPV18E7 wurde mit Hilfe des Vektors pET29a (Invitogen, mit c-terminalem His-tag exprimiert. Das die HPV18E7 Gensequenz enthaltende Plasmid lag bereits im Labor vor. (Promotion Dr. Marion Nonn, Heidelberg).

pEGFP/pEGFP-CMV (Clontech; modifiziert)

Für die Insert-Präparation der EGFP-cDNA wurde das Plasmid pEGFP verwendet. Die EGFP-cDNA wurde anschließend in den Vektor pBK-CMV kloniert.

Das Plasmid pEGFP-CMV lag bereits kloniert im Labor vor (Prof. Dr. Dürst, Jena). Dieses Plasmid wurde als Reporter gen für die Etablierung der DNA-Transfektion von DC eingesetzt.

2.1.8.5 RNA

Die zur Transfektion der DC eingesetzte RNA wurde von der Firma CureVac (Tübingen) hergestellt.

CAP-eGFP- β g-A70 RNA

CAP-E7WTo- β g-A70 RNA

CAP-E7SH- β g-A70 RNA

2.1.9 Eukaryontische Zelllinien und Bakterienstämme

2.1.9.1 Eukaryontische Zelllinien

Tabelle 2.1.3 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	ATCC-Nr.	Pathologie	Merkmale	Referenzen
T2	CRL-1992	B Lymphoblast, T-Lymphoblast, Hybrid	Tap-defizient	Salter et al., 1985
K562	CCL-243	Chronisch myeloide Leukämie	Zielzellen für <i>in vitro</i> NK-Assay, HLA-negativ	Ortaldo et al., 1972; Lozzio und Lozzio, 1975

2.1.9.2 Bakterienstämme

JM 109: recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi (lac-proAB)

TG1 (pREP4): supE hsd Δ 5 thi Δ (lac-proAB); F'[traD36 proAB⁺] lacI^qlacZ Δ M15

2.2 Arbeiten mit DNA

2.2.1 Restriktionsverdau

DNA wurde mit Hilfe von Restriktionsenzymen gespalten um die Enden von PCR-Fragmenten für die Ligation vorzubereiten oder um Plasmidpräparationen zu untersuchen. Die gewählten Bedingungen wurden abhängig von den Herstellerangaben gewählt.

2.2.2 DNA- Präzipitation

Ethanolpräzipitation

Die DNA- Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat angesäuert und mit dem zweifachen Volumen 100% Ethanol gefällt. Nach 20 min Inkubation bei -20°C wurde die

DNA durch 20 min Zentrifugation (14000 U/min, 4°C) pelletiert, das Pellet 70% Ethanol gewaschen und im gewünschten Puffer gelöst.

Isopropanolpräzipitation

Die DNA-Lösung wurde mit 0,6 Volumen Isopropanol versetzt, gemischt und anschließend 30 min bei RT inkubiert. Die ausgefällte DNA wird durch Zentrifugieren (30 min, 14000 U/min, 4°C) pelletiert, das Pellet in 70 % Ethanol gewaschen in H₂O aufgenommen.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA Lösungen wurde mittels Absorptionsmessung im Spektralphotometer bestimmt. Zur Berechnung der DNA-Konzentration wurde die für doppelsträngige Nukleinsäuren geltende Formel verwendet: $OD_{260\text{ nm}} = 50\text{ }\mu\text{g/ml DNA}$. Die Reinheit der DNA wurde über das Verhältnis der OD bei 260 nm und 280 nm abgeschätzt. Ein Verhältnis von OD 260nm: 280 nm von 2:1 weist auf sehr saubere DNA hin. Kleine DNA Mengen wurden im Agarosegel mit durch Vergleich mit Banden bekannter Konzentration abgeschätzt.

2.2.4 Agarose Gelelektrophorese

Es wurden 1% Agarosegele mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid verwendet. Die DNA wurde mit 6x Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei einer Spannung von 80-100 Volt. Nach dem Lauf wurde das Gel auf einem UV-Leuchttisch (λ 254 nm) mit einer Geldokumentationsanlage fotografiert.

6x Probenpuffer: 20 mM Tris- HCl, pH 7,5; 2 mM EDTA; 50% Sucrose, 0,2% Xylencyanol; 0,2% Bromphenolblau

2.2.5 Ligation

Es wurden 100 ng Vektor-DNA mit Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 2:1 eingesetzt. Die DNA wurde mit aqua dest. auf 18 μl aufgefüllt, 5 min bei 45°C inkubiert, um Plasmid-Dimere zu lösen und bei 0°C kurz abzentrifugiert. Es wurden 5 μl 5x Ligationspuffer und 2 μl T4 DNA-Ligase (1 U/ μl) zugesetzt. Anschließend wurde der Ansatz für 4 Stunden bei 16°C oder über Nacht inkubiert. Die Effizienz der Ligation wurde in einem Agarosegel kontrolliert. Dafür wurde 1/10 des Ligationsansatzes eingesetzt.

2.2.6 Gewinnung von Plasmiden im analytischen Maßstab nach Birnboim und Doley

- Resuspensionspuffer: 25 mM Tris-HCl pH8,0; 50 mM Glucose; 10 mM EDTA
- Denaturierungslösung: 0,2 M NaOH; 1%(w/v) SDS in deion. H₂O
- Renaturierungslösung: 7,5 M Ammoniumacetat

Von einer Bakterienkultur wurden 2 ml durch 1-minütiges Zentrifugieren bei RT und 14000 U/min pelletiert und das überstehende Medium entfernt. Das Bakterienpellet wurde in 100 μl Resuspensionspuffer resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 200 μl Denaturierungslösung zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 175 μl Renaturierungslösung und 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Präzipitat durch 15-minütige Zentrifugation bei 14 000 U/min und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 96% Ethanol gefällt (s. Abschnitt 2.2.3) Die gewonnene Plasmid-DNA wurde zur Überprüfung der Klonierung mittels Restriktionsspaltung und zur Sequenzierung eingesetzt.

2.2.7 Gewinnung von Plasmiden im präparativen Maßstab

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab wurde der InViTek Maxi-Kit“ gemäß Herstellerangaben verwendet. Für eine Präparation wurden 200 ml über

Nacht kultivierte Bakterienkultur eingesetzt.

2.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Umklonierung der Sequenzen von HPV16E7WT und -SH in den Vektor pQE9 wurde eine Amplifikation dieser Sequenzen mit Hilfe einer PCR durchgeführt. Hierfür wurden Primer mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen für die anschließende Klonierung gewählt. Die E7-Sequenzen wurden aus den Vektoren pTHampE7WT und -SH amplifiziert.

Der PCR-Ansatz war folgendermaßen zusammengesetzt:

DNA	x µl
dNTP	0,2 mM pro Nukleotid
Primer 1	2,5 pmol
Primer 2	2,5 pmol
10x Reaktionspuffer	a.d. 1x
MgCl ₂	0,5 mM
10xEnhancer	a.d. 1x
Platinum Pfx	0,5 U
<hr/>	
H ₂ O	ad 50 µl

Die Ansätze wurden nach folgendem Programm inkubiert:

<u>Amplifikation</u>	1. Denaturieren	94°C	2 min
	2. Denaturieren	95°C	15 sec
	3. Annealing	55°C	30 sec
	4. Elongation	68°C	1 min
	5. Elongation	68°C	10 min
	2, 3 und 4 = 30 Zyklen		

2.3 Arbeiten mit Bakterien

2.3.1 Herstellen kompetenter Bakterien

- Lösung A: 100 mM MgCl₂, 5 mM Tris pH7,4
- Lösung B: 100 mM CaCl₂, 5 mM Tris pH7,4
- Lösung C: 100 mM CaCl₂, 5 mM Tris pH7,4, 14% Glycerin

Mit einer Übernachtskultur wurde eine 200 ml Flüssigkultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 37°C bis eine optische Dichte von OD₆₀₀ ~ 0,4 inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Lösungen wurden auf Eis vorgekühlt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (5 min, 3000 U/min, 4°C) pelletiert und in 100 ml Lösung A resuspendiert. Anschließend wurde wiederum bei 4°C, 3000 U/min für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml Lösung B aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden erneut pelletiert (15 min, 3000 U/min, 4°C), in 2 ml Lösung C resuspendiert, aliquotiert und bei -70°C eingefroren.

2.3.2 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden die 200 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Danach wurde 2/3 des Ligationsansatzes zugegeben, und 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden für 2 min bei 42°C erhitzt und sofort wieder auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 0,8 ml LB-Medium wurde der Ansatz für 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Von dieser Kultur wurden dann 150 µl auf einer 1,5% LB Agar Platte mit Antibiotikumszusatz ausplattiert und über Nacht inkubiert. Zur Kontrolle der Transformationseffizienz wurde parallel dazu eine bekannte Menge an Plasmid-DNA transformiert (50 ng), und die

Transformationseffizienz bestimmt, indem die Zahl der Transformanten je 1 µg Plasmid-DNA berechnet wurde.

2.3.4 Glycerinkulturen von Bakterien

Die Lagerung von Bakterien über einen längeren Zeitraum erfolgt über Glycerinkulturen bei -80°C. Dazu wurden 900 µl einer Übernackkultur mit 100 µl Glycerin gemischt, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei -80°C eingefroren.

2.4. Arbeiten mit RNA

2.4.1 RNA Isolierung aus dendritischen Zellen

Um den Beweis zu erbringen, dass die E7SH und -WT Gene vom pTHamp Vektor exprimiert werden, wurde RNA aus transfizierten dendritischen Zellen isoliert um sie für Northern Hybridisierung und RT-PCR einzusetzen. Die Isolation erfolgte mit Trizol Reagenz (Invitrogen). Pro Isolationsansatz wurden 5×10^6 DC mit 1 ml Trizol Reagenz versetzt und 1 min gevortext und anschließend über Nacht bei -80°C gelagert, um einen vollständigen Aufschluß der Zellen zu erreichen. Die auf Raumtemperatur gebrachten Ansätze wurden anschließend zur Extraktion mit 200 µl Chloroform versetzt und 15 s gevortext. Nach 10 minütiger Inkubation und folgender Zentrifugation (14000 U/min, 15 min, 4°C) wurde die RNA-haltige wässrige obere Phase vorsichtig gewonnen. Die RNA wurde mittels Isopropanol-Präzipitation (vgl. Absatz 2.2.3) gefällt und in 50 µl RNase-freiem Wasser durch 10 min Inkubation bei 56°C gelöst. Der RNA Gehalt wurde photometrisch bestimmt und die RNA Qualität im Gel bestimmt.

2.4.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA wurde analog zur DNA Konzentrationsbestimmung durchgeführt (vgl. Absatz 2.2.4). Für einsträngige Nukleinsäuren gilt folgende Formel: $OD_{260\text{ nm}} = 40 \text{ µg/ml DNA}$

2.4.3 Agarose Gelelektrophorese mit MOPS-Gelen

10x MOPS pro Liter 4,6 g MOPS, 16,7 ml Na-Azetat pH5, 20 ml 0,5 M EDTA pH8
RNA-Laufpuffer pro 15 µl 1 µl 10x MOPS, 3,5 µl Formaldehyd, 10 µl Formamid
RNA-Ladungspuffer 50% Glycerin, Bromphenolblau, Xylenblau

Zur Probenvorbereitung wurden 1-2 µg RNA in maximal 5 µl RNase-freiem Wasser mit 15 µl RNA-Laufpuffer versetzt, für 10 min bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Vor dem Lauf wurden 3 µl RNA-Ladepuffer zugesetzt. Es wurden 1% Agarosegele (in 1x MOPS) verwendet. Als Laufpuffer für die Elektrophorese diente 1X MOPS. Die sonstigen Bedingungen entsprechen der in Absatz 2.2.5 beschriebenen Vorgehensweise.

2.4.4 Northern Hybridisierung

Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel 3x 20 min in 10x SSC gewaschen. Das Gel wurde mittels Biorad Vakuum Blotter geblottet (ca. 1,5 h, 5 Hg) auf eine Nylonmembran geblottet. Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte durch das so genannte Cross-Linken. Dazu wurde das Programm C3 des Biorad Cross Linker verwendet.

2.4.4.1 Sondenherstellung

Als DNA-Sonden wurden das HPV16E7WT Gen und das β-Actin Gen mittels Restriktionsspaltung aus den Vektoren herausgeschnitten und über eine Gelextraktion isoliert (vgl. Absatz 2.2.6). Die Markierung der DNA mit ³²P dATP wurde mit dem Random primed labeling Kit der Firma Roche durchgeführt. Für eine Markierung wurden 50 ng

DNA eingesetzt.

2.4.4.2 Hybridisierung

Vorhybridisierungslösung: 2,5 ml Formamid, 50 µl t-RNA (10mg/ml), 500 µl 10% SDS, 1,25 ml 20x SSC, 100 µl 50x Denhardt Reagenz, 250 µl 1 M NAPP, 350 µl a. dest.

Hybridisierungslösung: 2,5 ml Formamid, 50 µl t-RNA (10 mg/ml), 500 µl 10% SDS, 1,25 ml 20x SSC, 100 µl 50x Denhardts Reagenz, 100 µl 1M NAPP, 400 µl a. dest., 100 µl markierte Sonde

Die Vorhybridisierung der Membran erfolgte über Nacht in 5 ml Vorhybridierungs-lösung bei 42°C und einer Rotation von 7 U/min und die Hybridisierung über 48h in 5 ml Hybridisierungslösung unter ansonsten gleichen Bedingungen.

2.4.4.3 Exposition

Die Membran wurde 3x 30 min in 2x SSC, 0,1% SDS bei 68°C gewaschen, in Frischhaltefolie verpackt und der Film aufgelegt. Die Expositionsdauer richtete sich nach der Stärke des Signals.

2.4.5 RT-PCR

Die aus den transfizierten DC isolierte RNA wurde mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben (Primer s. Abschnitt 2.1.8.2). Mit dieser cDNA wurde eine PCR mit spezifischen Primern für HPV16E7WT und -SH durchgeführt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes sowie die Reaktionsbedingungen sind in Abschnitt 2.2.10 beschrieben. Die PCR-Reaktionen wurden im Agarosegel auf die Größe und Spezifität der Fragmente untersucht.

2.5. Analyse und Nachweis von Proteinen

2.5.1 Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel

- Acrylamidlösung 30% (w/v) 29:1 Acrylamid:Bisacrylamid
- 4x Tris-HCl/SDS-Puffer pH6,8: 0,5 M Tris-HCl pH6,8 in H₂O; 0,4% SDS
- 4x Tris-HCl/SDS-Puffer pH8,8: 3 M Tris-HCl pH8,8 in H₂O; 0,4% SDS
- APS (Ammoniumpersulfat): 10% (w/v) in H₂O
- 6x SDS-Ladepuffer: 7 ml 4x Tris-HCl/SDS, 3 ml Glycerin (87%); 1 g SDS; 0,93g Dithiothreitol (DTT); 1,2 mg Bromphenolblau
- SDS-Gelelektrophoresepuffer: 25 mM Tris, 250 mM Glycin pH8,3; 0,1% SDS in H₂O
- Bio Rad low range molecular weight standard (BioRad)

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde das diskontinuierliche Verfahren nach Laemmli (1970) eingesetzt. Die Protein-Proben wurden mit 6x SDS-Ladepuffer versehen und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 45-60 min bei 30-40 mA bis die Lauffront des Bromphenolblaus das Ende des Gels erreicht hatte. Danach wurde das Gel entweder gefärbt oder geblottet.

2.5.2 Färben von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Brilliant-Blau

- Coomassie-Färbelösung: 50%(v/v) Methanol, 10% (v/v) Eisessig, 0,02% (w/v) Coomassie Brilliantblau in H₂O
- Entfärbelösung: 10%(v/v) Methanol, 7%(v/v) Eisessig in deion. H₂O

Die Gele wurden 30 min im Färbabad geschwenkt und anschließend in die Entfärbelösung überführt.

2.6 Isolierung von Proteinen

Zur Etablierung des Talon ELISA wurden die His-getaggten Proteine in aufgereinigter

Form eingesetzt um die notwendige Proteinkonzentration ermitteln zu können und die Spezifität der Bindung des Proteins an die Talon Beads zu gewährleisten. Die Aufreinigung wurde in Anlehnung an das Protokoll zur denaturierenden Aufreinigung von Proteinen des Quiagen Expressionist (2003) durchgeführt.

2.6.1 Expression der Proteine in Bakterien

Die Übernachtskultur wurde von einer auf LB-Agar mit Antibiotikazusatz gewachsenen Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C inkubiert. Die Übernachtskultur wurde 1:20 in 1l LB-Medium mit Antibiotika überführt. Bei einer OD (600 nm) von 0,4 wurde die Expression des Proteins durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die weitere Kultivierung der Bakterienkultur erfolgte bei 30°C. Die Bakterienzellen wurden 6h nach der Induktion auf Eis heruntergekühlt, abzentrifugiert (3000 U/min, 15 min, 4°C) und das Pellet einmal mit eiskühlem PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet bei -80°C eingefroren, um den Aufschluss der Bakterien zu verbessern. Vor der Induktion der Proteinexpression und nach der Ernte der Zellen wurde jeweils eine Probe genommen. In der SDS-PAGE wurde damit die erfolgreiche Induktion der Proteinexpression bestätigt.

2.6.1.1 Zellyse

Lysepuffer: 100 mM Na₂PO₄; 10 mM Tris-HCl; 8 M Harnstoff; 1 mM PMSF, pH8

Das Bakterienpellet wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und in 5 ml Lysepuffer pro Gramm Feuchtgewicht resuspendiert. Die Suspension wurde 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln lysiert. Das Lysat wurde 20 min bei 14 000 U/min und Raumtemperatur abzentrifugiert. Nicht entfernte feste Bestandteile wurden mit einem Filter (Porengröße 0,45 µm) entfernt.

2.6.1.2 Isolation der Proteine über Nickel- Agarose (Ni-NTA)

Waschpuffer : 100 mM Na₂PO₄; 10 mM Tris-HCl; 8 M Harnstoff; 1 mM PMSF, pH 6,3

Elutionspuffer: 100 mM Na₂PO₄; 10 mM Tris-HCl; 8 M Harnstoff, pH 4,5

Die Proteine wurden mit Hilfe der Biorad Econo-Systems aus dem Lysat isoliert. Als Säulenmaterial diente Ni-NTA. Das Proteinlysate wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min auf eine selbstgegossene 10 ml Ni-NTA Säule geladen. Es folgte ein Waschschrift bei pH6,3 (Flussgeschwindigkeit 2 ml/min, 5 Säulenvolumen). Eluiert wurden die Proteine bei pH4,5 bei einem Durchfluß von 1 ml/min. Die Qualität der Aufreinigung wurde in einer SDS-PAGE kontrolliert und der Proteingehalt des Eluats bestimmt. Weitere Reinigungsschritte waren nicht notwendig. Die isolierten Proteine konnten direkt im Talon-ELISA eingesetzt werden. Die Proteine sind bei 4°C stabil und können so über längere Zeit gelagert werden.

2.7. Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

T-Zellen wurden in RPMI + 10% AB Plasma (hitzeinaktiviert) kultiviert. Zu Beginn der Arbeit wurde den T-Zellkulturen ab der zweiten Stimulation 10 U/ml IL-2 und IL-7 zugesetzt, später wurden 100 U/ml dieser Interleukine zugegeben.

Das Anlegen von T-Zelllinien erfolgte nach folgendem Prinzip: Naive T-Zellen wurden in wöchentlichem Abstand dreimal mit antigenbeladenen DC stimuliert. Dabei wurde nach Möglichkeit ein Verhältnis von T-Zellen zu DC von 10:1 eingesetzt. Anschließend folgte eine Ruhephase von drei Wochen, damit die T-Zellen ihre Proliferation einstellen konnten. Während dieser Zeit wurde wöchentlich 50% des Mediums erneuert.

2.7.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

2x Einfriermedium (60% Medium, 20% Human-Albumin, 20% DMSO, 40 U/ml Liquemin)

Zum Einfrieren der Zellen wurden 10^5 bis maximal 5×10^7 Zellen (je nach Zelltyp: DC von 10^5 - 10^6 , PBL bis maximal 5×10^7 Zellen) in einem Kryoröhrchen in 1 ml Medium aufgenommen und tropfenweise 1 ml Einfriermedium zugegeben. Die Kryoröhrchen wurden zunächst 10 min auf Eis vorgekühlt, danach in einem Styroporgefäß in einen -80°C -Tiefkühlschrank überführt und am nächsten Tag in Flüssigstickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen schnell in einem 37°C -Wasserbad aufgetaut und mit 10 ml Medium verdünnt. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert, und in Kulturmedium aufgenommen.

2.7.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer.

Hierfür wurden 20 μl einer Zellsuspension mit Trypanblau 1:2 verdünnt und in eine Neubauer Zählkammer transferiert. Die lebenden Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Zellzahl zweier Quadranten wurde mit dem Faktor 10^4 multipliziert, um die Gesamtzellzahl pro ml zu bestimmen.

2.8 Gewinnung von Zellen aus Buffy Coats

Für die Isolation von peripheren Blutlymphozyten (PBL) wurden Buffy coats verwendet. Buffy coats sind aufkonzentrierte zelluläre Bestandteile des Bluts von gesunden Donoren. Etwa 90 ml entsprechen einem Äquivalent von 450 ml Vollblut einer Blutspende. Durch Zusatz von Citrat wird die Gerinnung des Bluts verhindert. Die Buffy coats wurden von der Blutbank Suhl bezogen. Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurde uns das Geschlecht der jeweiligen Donoren nicht mitgeteilt. Das Alter der Blutspender lag zwischen 18 – 60 Jahren.

2.8.1 PBL Isolation

Der Inhalt eines Buffy Coats wurde auf drei 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt. Nach Verdünnung mit PBS wurde das Blut mit 11 ml Ficoll-Paque unterschichtet, 25 min bei 2200 U/min und RT zentrifugiert und ohne Bremse auslaufen gelassen. Der Überstand aus Plasma und PBS wurde abgesaugt und die Interphasen gesammelt. Die Zellen wurden viermal mit 50 ml RPMI gewaschen (Zentrifugation: 1. 1800 U/min; 2. 10 min 1600 U/min; 3. 1400 U/min und 4. 1200 U/min, jeweils 10 min und RT) und entweder eingefroren oder direkt für weitere Experimente verwendet.

Für viele Experimente war es von Bedeutung, ob die isolierten PBL das HLA-A2-Allel exprimieren. Deshalb wurde vor der Aufreinigung ein Aliquot des Blutes in ein Cluster Tube Individual (1,2 ml) überführt und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern indirekt gegen HLA-A2 gefärbt. Nach Färbung mit dem Erstantikörper wurde bei der 2. Waschung statt PBA der ACK-Puffer (0,15 M NH_4Cl ; 1 mM KHCO_3 ; 0,1 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, pH7, sterilfiltriert) verwendet, um die enthaltenen Erythrozyten zu lysieren. Die gefärbten Zellen wurden anschließend im FACS auf HLA-A2-Positivität analysiert. PBL und alle daraus generierten Zellen wurden gegebenenfalls zur längeren Lagerung kryokonserviert.

2.8.2 Generierung und Reifung dendritischer Zellen aus PBL

Die DC wurden aus Monozyten des Blutes nach einem modifizierten Protokoll von Romani et al., 1996 generiert. 5×10^7 PBL wurden in 75 cm^2 Zellkulturschalen in 5 ml RPMI + 10% AB-Plasma ausgesät und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die nicht adhärennten Zellen durch vorsichtiges Schwenken gelöst und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden durch Zugabe von 4-5 ml PBS 3x gewaschen. Die nicht adhärennten Zellen wurden entweder eingefroren oder für die T-Zellisolierung eingesetzt.

Die adhärennten Zellen, bestehend aus dendritischen Vorläuferzellen, die sich innerhalb von 24 Stunden wieder von der Plastikunterlage ablösen, und dauerhaft adhärennte Makrophagen sowie einem Rest von T-Zellen, B-Zellen und Blutplättchen, wurden mit 5 ml RPMI +10% AB-Plasma in Kultur genommen und mit IL-4 (1000 U/ml) und GM-CSF (1000 U/ml) supplementiert. GM-CSF unterstützt die Differenzierung der Monozyten in DC, während IL-4 die Makrophagen-Entwicklung unterdrückt. Nach 3-4 Tagen erfolgte eine Zugabe von 2 ml frischen Mediums und Interleukinen. Nach 6 Tagen wurden die unreifen DC geerntet.

2.8.3 Isolation von T-Zellen aus PBL durch Schafserythrozyten -Rosettierung

Zur T-Zellisolation wurde die nicht-adhärennten PBL genutzt. 2 ml Schafserythrozyten wurden zunächst dreimal vorsichtig in 10 ml RPMI gewaschen (Zentrifugation: 10 min bei 1500 U/min, 4 °C) und anschließend in 40 ml RPMI aufgenommen, so dass sich eine Erythrozytenkonzentration von 5% (w/v) ergab. Währenddessen wurden die PBL in 20 ml RPMI+1% AB-Plasma resuspendiert und 30 µl der Erythrozytensuspension pro 1×10^6 PBL zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Zellen 5 min bei 600 U/min zentrifugiert und danach 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit adhären die Schafserythrozyten an den CD2-Rezeptor der T-Zellen und bilden „Rosetten“. Danach wurde der Überstand auf 15 ml abgesaugt, die Zellen vorsichtig durch Schwenken resuspendiert und mit 11 ml Ficoll unterschichtet. Der Ansatz wurde 25 min bei 2200 U/min zentrifugiert und ohne Bremse auslaufen gelassen. Der Überstand wurde verworfen und die Interphase für die Generierung von B-LCL geerntet. Die Erythrozyten wurden im Restmedium resuspendiert und durch Zugabe von 2 ml ACK-Puffer lysiert. Die freigesetzten T-Zellen wurden dreimal mit 10 ml RPMI gewaschen (Zentrifugation: 5 min bei jeweils 1400, 1200, 1000 U/min, RT) und entweder eingefroren oder direkt für immunologische Experimente verwendet.

2.9. Selektion von CD8⁺-Lymphozyten aus T-Zellkulturen mit Hilfe magnetischer „DynaBeads“ (DB)

Die CD4⁺- und CD8⁺- T-Zellen der *in vitro* induzierten T-Zelllinien wurden in einigen Versuchen getrennt voneinander auf ihre Spezifität hin untersucht. Aus diesem Grund wurde eine CD8⁺ T Zellselektion der gesamten T Zellpopulation durchgeführt. Dafür wurden magnetische „DynaBeads“ (DB) gemäß des Herstellerprotokolls verwendet, an die ein monoklonaler Antikörper gegen das humane CD8-Molekül gekoppelt ist. Nach Bindung der T-Zellen an die DB war es mit Hilfe einer Magnetvorrichtung möglich, die CD8⁺ T Zellen aus der Gesamtpopulation zu isolieren. Die Konzentrationsbestimmung der CD8⁺ T-Zellen erfolgte mit Hilfe einer FACS-Färbung. Die getrennten T Zellpopulationen wurden am Ende gewaschen und in 50% konditioniertes Medium und 50% RPMI-Medium + 10% AB-Plasma aufgenommen und in eine 96-Lochplatte ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die CD8⁺ T Zellen eingesammelt, die DB mit Hilfe des Magneten entfernt und erneut ausgesät. Die Zellen wurden innerhalb der nächsten 2-4 Tage analysiert. Die Reinheit dieser Selektion wurde mittels FACS-Analyse überprüft und lag bei 97%.

2.10. Antigenbeladung von Stimulatorzellen

2.10.1 Beladung mit 9mer Peptiden

Für die Generierung von peptid-spezifischen T-Zelllinien und als Stimulatoren für die Analyse wurden DC mit HLA-A*0201 restringierten Peptiden beladen. Dafür wurden die DC mit 10 µg/ml Peptid für 4h in serumfreiem Medium beladen. Durch zweimaliges Waschen wurde überschüssiges Peptid entfernt. Anschließend wurden die DC in komplettem Medium aufgenommen und durch Zusatz von Zytokincocktail über Nacht ausdifferenziert. Durch 3maliges Waschen der Zellen wurden die Zytokine entfernt, die

Zellen gegebenenfalls bestrahlt und für die Versuche eingesetzt. B-LCL wurden auf die gleiche Art beladen, hier entfällt die Zugabe des Zytokincocktails. T2 Zellen benötigen den Zusatz von 3 µg/ml β -3 Mikroglobulin, um stabile MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche zu exprimieren.

2.10.2 Beladung mit 35mer Peptiden

Die Beladung DC mit 35mer Peptiden erfolgte analog zu dem modifizierten Protokoll von Santin et al., 1999, dass zur Beladung von DC mit Proteinen etabliert wurde. Die Beladung mit Peptid wird dabei im Komplex mit Lipiden durchgeführt. Ausgehend von dem unten genannten Protokoll (Marion Nonn, Heidelberg, Dissertation) wurden im Verlauf dieser Arbeit weitere Modifikationen zur Optimierung der Methode durchgeführt. Für die Beladung wurden 20 µg Peptid mit 25 µg des kationischen Lipids DOTAP für 20 min in 125 µl RPMI präkomplexiert. Währenddessen wurden die DC (10^5 - 10^6) einmal in serumfreien Medium gewaschen und in 500 µl serumfreien RPMI-Medium resuspendiert. Der Peptid-Lipid-Komplex wurde mit den Zellen gemischt und für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die DC wurden im Anschluß 2x gewaschen und über Nacht ausdifferenziert.

2.10.3 Transfektion von DC mit DNA und RNA mit der Amaxa-Technologie

Ausgehend von der Herstellerbeschreibung für den Human Dendritic Cell Nucleofector™ Kit der Firma Amaxa (Köln) wurde das Transfektionsprotokoll modifiziert (siehe Ergebnisse). Das Ausgangsprotokoll sieht vor, dass 2×10^5 - 1×10^7 unreife DC in 100 ml Nukleofektionslösung aufgenommen werden und mit 1-5 µl DNA mit dem vorgegebenen Programm U-02 transfiziert werden. Anschließend wurden die DC in komplettes Medium überführt und über Nacht ausdifferenziert.

2.11 Phänotypisierung von Zellen mittels Durchflußzytometrie

Blockinglösung: 20% FCS, 20% Human-Plasma in PBA

PBA: 5% hitzeinaktiviertes FCS oder 1% BSA in PBS, 0,1% Na-Azid pH7,2

PBS pH7,2: 8g NaCl; 0,2g KCl, 0,2g KH_2PO_4 ; 1,15g Na_2HPO_4 auf 1 l H_2O ,

Fixierlösung: 3,7%(v/v) Formaldehyd in PBS

Je 10^4 - 5×10^5 Zellen wurden in 1,2 ml-Röhrchen (Cluster Tubes) gegeben und die Zellen bei 700 U/min für 5 min bei RT zentrifugiert (Megafuge 1.0; Rotor 2704). Das Zellpellet wurde resuspendiert 30-minütigen Inkubation auf Eis mit 50 µl Blocking-Lösung geblockt. Danach wurde der Erstantikörper bzw. der direkt markierte Antikörper zugegeben, gemischt und 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen mit 500 µl PBA entfernt. Bei einer indirekten Färbung wurden 50 µl verdünnter Zweitantikörper zugegeben und nach gründlichem Mischen 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit PBA und einmal mit PBS gewaschen und mit 100 µl Fixierlösung (1:2 in PBS verdünnt) versetzt. Die Analyse der Zellen erfolgte am Durchflußzytometer FACS Calibur mit der dazugehörigen CellQuest Pro Software.

2.12. funktionelle immunologische Assays

2.12.1 Interferon- γ ELISpot

Das Prinzip des ELISpot-Assays entspricht dem eines Sandwich-ELISA. Auf einem mit anti-IFN- γ beschichteten Nitrozellulose-Filter werden CD8^+ T-Zellen oder T-Zellen mit entsprechenden Stimulatoren kultiviert. Bei spezifischer Stimulation setzen die CD8^+ T-Zellen IFN- γ frei, das an den anti-IFN- γ -Antikörper auf dem Filter bindet. Die Zellen werden durch Waschen entfernt und der Filter mit einem zweiten, biotinylierten α -IFN- γ -Antikörper

inkubiert. Das Biotin wird nach Zugabe von Streptavidin gebunden, an das eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Die alkalische Phosphatase setzt das Farbreagenz (BCIP/NTB) zu einem wasserunlöslichen, blauen Reagenz um. Jede INF- γ sezernierende Zelle erzeugt somit einen Spot. Anhand der Spots und der ausgesäten Zellzahl kann man auf die Frequenz der spezifischen T-Zellen berechnen.

Eine Nitrozellulose HA-Platte wurde über Nacht bei 4°C mit dem monoklonalen Antikörper 1-D1k anti-human IFN- γ (10 μ g/ml in PBS; 60 μ l /well) beschichtet. Die CD8⁺T-Zellen (2×10^4 - 10^5 /Vertiefung) wurden mit den Stimulatoren (2×10^3 - 10^4 /Vertiefung) in eine 96-Well-Rundbodenplatte ausgesät und für 4 Stunden inkubiert. Die Nitrozellulose-Platte wurde 3x mit 150 μ l/Vertiefung PBS gewaschen und 1 h bei 37°C mit RPMI/1% Human-Albumin geblockt. Nach Entfernen der Blocking-Lösung wurden die Ansätze der Rundbodenplatte auf die Filterplatte übertragen und 20 Stunden (+/-2) im Brutschrank inkubiert. Die Filterplatte wurde 6x 2 min mit PBS/Tween 20 gewaschen und mit dem Antikörper Ab-7-B6-1-biotin (2 μ g/ml in PBS/BSA 0,5%) für 2 Stunden bei 37°C oder ÜN bei 4°C inkubiert und 6x 2 min gewaschen. Es erfolgte eine Zugabe von Streptavidin-alkalische Phosphatase-Komplex (50 ng/ml in PBS). Nach 2 Stunden Inkubation bei RT wurde die Filterplatte 3x 2 min mit PBS/Tween 20 und 3x 2 min mit PBS gewaschen. Pro Well wurden 100 μ l BCIP/NBT-Substrat zugesetzt und 2 Stunden bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit Wasser abgestoppt. Die Auszählung der Spots erfolgte am ELISpot-Auslese-System der Firma Zeiss (Zeiss-Vision C). Die Ansätze wurden in Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt. Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Ein Ergebnis wurde dann als spezifisch bezeichnet, wenn sich die Standardabweichungen des Ergebnisses und der entsprechenden Kontrolle nicht überschneiden und der Students t-Test einen p-Wert < 0,05 ergab.

2.12.2 ³H Proliferationsassay

Die spezifische Proliferation von Lymphozyten in Gegenwart von Stimulatoren wurde durch den Einbau von ³H-markiertem Thymidin in die DNA bestimmt. Dazu wurden jeweils 10^5 Zellen in einer Vertiefung einer 96-Loch-Rundbodenplatte mit 5×10^3 - 10^4 Stimulator-Zellen in insgesamt 200 μ l RPMI + 10% AB-Plasma für 3 Tage kultiviert. Die Stimulatoren wurden zuvor 2x mit 30 Grey bestrahlt, um deren Grundproliferation zu minimieren. Es wurden 25 μ l Medium mit 5 μ Ci/ml ³H-Thymidin pro Vertiefung zugesetzt und für 16 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden durch einmaliges Einfrieren bei -70°C und Auftauen bei 37°C aufgeschlossen. Die freigesetzte DNA wurde mit Hilfe eines Erntegerätes auf eine Filterplatte transferiert und das nicht gebundene ³H-Thymidin gewaschen (12x). Für eine optimale Trocknung der Filter wurde die Filterplatte mit Isopropanol gewaschen. Nach dem Trocknen der Platte wurde der Boden mit einer Klebefolie versiegelt und 25 μ l Szintillatorflüssigkeit (Microscint O) pro Vertiefung zugegeben. Die Oberfläche wurde mit Folie abgedeckt, und die Filterplatte in einem Szintillationszähler vermessen. Dabei wird die Energie der radioaktiven β -Strahlung durch die Szintillationsflüssigkeit absorbiert und im Szintillationszähler in sichtbare Strahlung (Lichtblitze) umgewandelt, die photoelektrisch als counts per minute (cpm) registriert wird.

Es wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung der Triplikate bestimmt.

Ein Ergebnis wurde dann als positives bezeichnet, wenn sich die jeweiligen Standardabweichungen der Werte in Bezug zur Kontrolle nicht überschneiden und der Students t-test ein Ergebnis von p < 0,05 ergab.

2.12.3 CFSE-Proliferationsassay

Der CFSE-Proliferationstest ist eine durchflußzytometrische Methode zur Ermittlung der spezifischen Proliferation von T-Zellen in Gegenwart von Stimulatorzellen. Hierfür wurden die T-Zellen mit dem grünen Farbstoff Carboxy-Fluorezein-Diacetat-Succinylester (CFSE)

markiert. Sie wurden zweimal in PBS gewaschen und in einer Konzentration von 0,25 μ M CFSE in PBS bei einer Zelldichte von 1×10^7 /ml für 8 min gefärbt. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Zellen für den Assay eingesetzt. In einer 96-well Rundbodenplatte wurden 1×10^5 T-Zellen /well mit 1×10^4 bestrahlten Stimulatorzellen (60 Grey) für 3-7 Tage (meistens 5 Tage) inkubiert. Alle Ansätze wurden nach Möglichkeit in Triplikaten angesetzt.

Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Proliferationsansätze in Cluster tubes überführt und eine direkte CD8- Färbung gemacht. Die Messung der Proliferation erfolgte am FACSCalibur. Die Proliferation wurde als Abnahme der Intensität der CFSE-Färbung gemessen. Dabei konnte Aufgrund der CD8-Färbung zusätzlich zwischen der Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unterschieden werden. Die Mittelwerte und die Standardabweichung der Triplikate wurden bestimmt.

Als positiver Nachweis für spezifische Proliferation wurde gewertet, wenn sich die Standardabweichungen der Kontrolle und des spezifischen Ansatzes nicht überschneiden und der students t-test ein Ergebnis von $p < 0,05$ ergab.

2.13 Talon ELISA

Wasch-und Bindepuffer (W+B) nach Herstellerprotokoll:
50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8; 300 mM NaCl; 0,01% Tween-20

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode zur durchflußzytometrischen Messung von Antikörpern in Seren basiert auf paramagnetischen Polystyrolpartikeln, den sogenannten Talon Beads der Firma Dynal Biotech. Die 1 μ m großen Beads wurden zur Isolation von His-getaggtten Proteinen entwickelt. Die Bindung der Proteine an die Partikel erfolgt über eine Metall-Chelat-Bindung, deren Komplex Kobalt als Zentralatom enthält. Diese Technologie soll laut Hersteller höhere Spezifität garantieren, als das etablierte Nickel-Agarose-System. Die Etablierung der vollständigen Beladung der Talon Beads mit Protein und die Methodenentwicklung zur von uns als Talon ELISA bezeichneten Methode war Teil der vorliegenden Arbeit und wird im Ergebnisteil unter 3.1 ausführlich behandelt. Das Herstellerprotokoll für die Proteinisolation war Grundlage für die Auswahl der Puffer und der Entwicklung der Proteinbeladung.

Für die Reinigungsschritte wurden die Magneten der Firma Dynal verwendet. Als Waschpuffer, sowie als Puffer für die Antikörperbindung wurde der W+B-Puffer eingesetzt. Die Bindungsbedingungen für die Antikörper wurden auf Grund von Erfahrungen mit Western Blot und FACS-Färbung variiert. Die Messung der gefärbten Beads erfolgte am Durchflußzytometer. Die Geräteeinstellungen wurden mit Hilfe von Erfahrungswerten entwickelt. Zur Etablierung der Methode wurde ein Satz von 100 bereits anhand einer anderen Methode getesteten Patientenseren eingesetzt.

Die statistische Auswertung dieser Ergebnisse erfolgte zum einen über Korrelationsanalysen. Hierzu wurde der Pearsonsche Korrelationskoeffizient mit Hilfe der Excel-Statistik ermittelt.

Für die κ -Analysen wurde zunächst der cut-off als Mittelwert negative Seren +3 Standardabweichungen ermittelt.

Der κ -Rechner www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1.cfm eingesetzt für die κ -Analysen eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 „Talon ELISA“ Entwicklung einer durchflußzytometrischen Methode zum Nachweis von Antikörpern in Patientenseren

Das Ziel der in diesem Teilabschnitt beschriebenen Experimente war, eine Methode zu etablieren, die es ermöglichte, Antikörper in Patientenseren am Durchflußzytometer nachzuweisen. Die Grundidee war es, mit His-tag fusionierte Proteine an magnetische Partikel (Talon Beads) zu binden. Die antigenbeschichteten Partikel sollten die in den Seren enthaltenen spezifischen Antikörper binden. Mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten α -human IgG-Antikörpers sollte die Bindung der spezifischen Antikörper am Durchflußzytometer meßbar gemacht werden. Zur Etablierung der Methode wurden die rekombinanten Proteine HPV16E7WT, HPV16E7SH und HPV18E7 verwendet. Das Prinzip dieser als „Talon-ELISA“ bezeichneten Methode ist in Abb. 3.1.1 dargestellt.

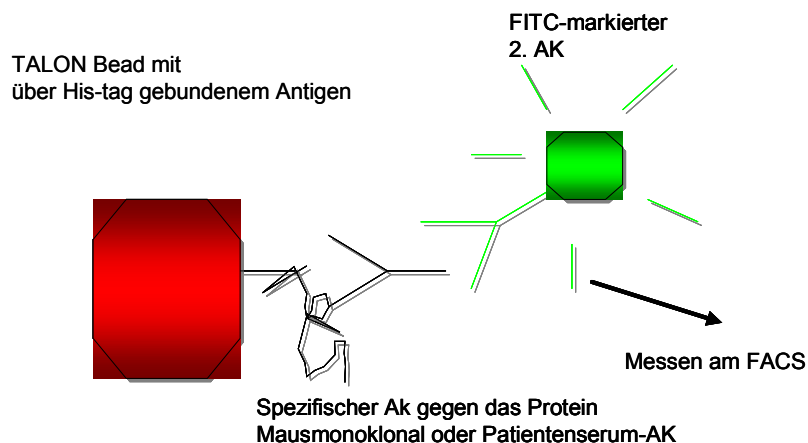


Abb. 3.1.1: Übersichtsdarstellung der Methode „Talon ELISA“

3.1.1 Klonierung der Expressionsvektoren zur Gewinnung der Proteine

Für die Durchführung der Methodenetablierung mussten die Proteine als His-Tag-Fusionsproteine kloniert und isoliert werden. Der Vektor (pET29a), der HPV18E7 mit einem N-terminalen His-tag exprimierte lag bereits vor (Marion Nonn, Doktorarbeit Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2002). HPV16E7WT und -E7SH wurden in den Expressionsvektor pQE9 (Invitrogen) kloniert. Mit Hilfe einer Klonierungs-PCR wurden die Gene mit den Erkennungssequenzen für BamHI und HindIII versehen. Als Matrize dienten die Vektoren pTHamp-HPV16E7WT und pTHamp-HPV16E7SH (Peter Öhlschläger, Doktorarbeit Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2003). Über die in die Sequenz eingebauten Restriktionsschnittstellen wurden die Fragmente in den Expressionsvektor ligiert. Abb. 3.1.2 A zeigt die PCR-Fragmente.

Der ligierte Vektor wurde in den Bakterienstamm TG1pREP4 transformiert, der die Gene

für die Regelung der Expression für pQE9 enthält. Minipreps von Klonen dieser Transformation wurden durch Restriktionsanalyse verifiziert. Abb. 3.1.2 B zeigt die Restriktion mit BamHI und HindIII, durch die in den gesuchten Klonen das Insert herausgespalten wurde. Die in der Restriktionsanalyse gefundenen Klone wurden anschließend sequenziert.

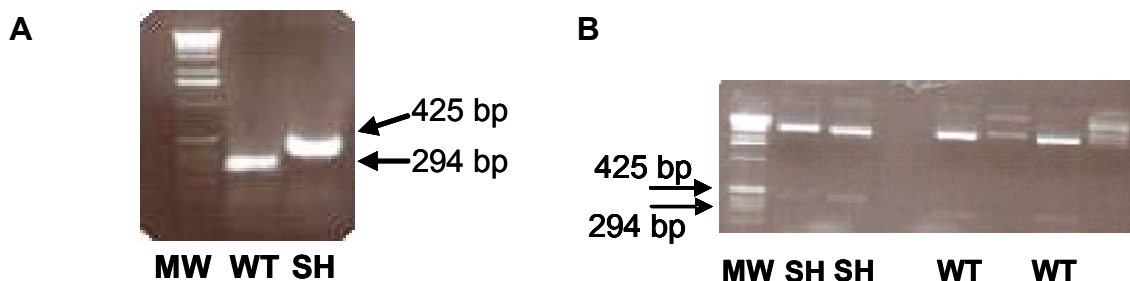


Abb. 3.1.2: (A) Agarosegel der Amplifikationsprodukte der PCR zur Gewinnung der Genfragmente zur Umklonierung von HPV16E7WT und –SH in den bakteriellen Expressionsvektor pQE9. (B) Agarosegel der Restriktionsanalyse von pQE9HPV16E7WT und –SH Klonen. Für den Verdau wurden die Klonierungsschnittstellen BamHI und HindIII verwendet. Die Inserts konnten in der richtigen Größe von 294 bp für E7WT und 425 für E7SH aus jeweils zwei positiven Klonen herausgeschnitten werden. MW: Molekulargewichtsstandard; WT: Genfragment HPV16E7WT; SH: Genfragment HPV16E7SH

3.1.2 Expression und Aufreinigung der Proteine

Um für die Methodenoptimierung zu wissen, welche Proteinkonzentrationen eingesetzt wurden, sollte mit aufgereinigtem Protein gearbeitet werden. Die Bakterienklone TG1pREP4/pQE9HPV16E7WT und –HPV16E7SH, sowie BL21DE3/ pET29aHPV18E7 wurden zunächst in analytischem Maßstab auf die Proteinexpression getestet. Die Kulturen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase mit IPTG induziert. Vor der Induktion und 4 h nach der Induktion wurden Proben genommen. Diese wurden in einer SDS-PAGE analysiert. Abb. 3.1.3 zeigt, dass 4 h nach der Induktion des Klons pQE9E7WT eine Bande auf der Höhe von etwa 18 kDa erscheint. Dies ist die in der Literatur beschriebene Laufhöhe für das HPV16E7 Protein. Aufgrund der Primärsequenz des Proteins wird eine Laufhöhe in der SDS-PAGE von etwa 11 kDa erwartet. Als Grund für dieses abweichende Laufverhalten des Proteins in der SDS-PAGE wird der Asparaginsäurerest an Position 4 verantwortlich gemacht (Armstrong, et al. 1992). Die Aufreinigung der His-getaggten Proteine erfolgte über die Bindung des 6xHis-Tags an die Ni-NTA (Qiagen). Alle vier Proteine wurden sowohl nach dem Protokoll für native Bedingungen als auch nach dem Protokoll für denaturierende Bedingungen des QIAexpressionist (2003) der Firma Qiagen isoliert. Die Sauberkeit wurde in der SDS-PAGE überprüft. Abb. 3.1.3 zeigt beispielhaft die Induktion und das aufgereinigte Protein von HPV16E7WT. Die verbliebenen Verunreinigungen bzw. Degradationsprodukte lagen

unter 5% des Gesamtproteins und wurden als tolerierbar angesehen. Andere Proteine waren vergleichbar.

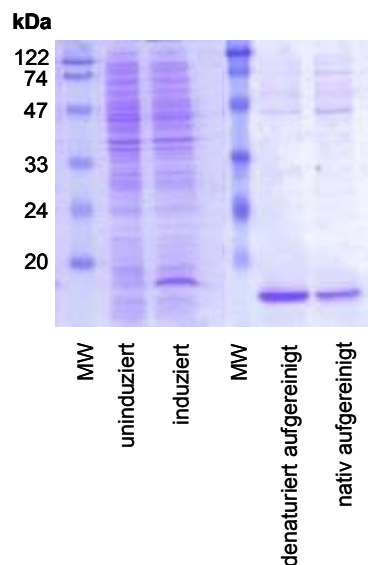


Abb. 3.1.3: SDS-Page zur Induktion der Proteinexpression und der Aufreinigung von HPV16E7WT.

3.1.3 Eingangsversuch zum Prinzip des Talon-ELISA

Dieses Experiment stellte einen ersten Test dar, der zeigen sollte, dass die Idee Talon Beads als Matrix für eine dem ELISA ähnliche Methode zu verwenden prinzipiell umsetzbar war. Die Bedingungen wie z.B. die Antikörperversdünnung und die Zeiten für die Antikörperbindung wurden zunächst aufgrund der Herstellerangaben zu den Talon Beads und Erfahrungen mit anderen Methoden gewählt. Das rekombinant exprimierte Protein HPV16E7WT wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml in 50 mM Phosphatpuffer pH8, 300 mM NaCl und 0,01% Tween-20 (W+B-Puffer) aufgenommen. Zu 1 ml dieser Proteinlösung wurden 5 µl der Talon Bead-Ausgangssuspension (= 2 mg) gegeben. Unter leichtem Schwenken auf einem Wipptisch wurden die Beads bei Raumtemperatur für 30 min beladen. Anschließend wurden die Beads mit Hilfe eines Magneten viermal mit W+B Puffer gewaschen. Um die Beladung der Beads zu kontrollieren wurden 100 µl 1:10 verdünnter monoklonaler Maus- α -HPV16E7 Antikörperüberstand NM2 (zur Verfügung gestellt von Nico Michel, DKFZ, Heidelberg) eingesetzt. Unter leichtem Schütteln wurden die Beads für 30 min mit diesem Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Nach vier weiteren Waschschritten erfolgte eine Anfärbung mit einem FITC-markierten Ziege α -Maus Antikörper (Jackson ImmunoResearch) in der Verdünnung 1:100 in W+B-Puffer. Nach vier weiteren Waschschritten wurden die angefärbten Beads im Durchflusszytometer gemessen. Als Kontrolle dienten proteinbeladene Beads, die ohne Zugabe des α -HPV16E7 Antikörperüberstands gefärbt wurden. Bei der Einstellung von

Foreward- und *Sideward-Scatter* zeigte sich, dass die Beads in distinkten Populationen dargestellt wurden (Abb. 3.1.4 A). Da die Beads in dieser Darstellung nach Größe und Granularität der Oberfläche differenziert werden, wurde davon ausgegangen, dass es sich bei diesen Populationen um Singletts, Dubletten, sowie größere Beadassoziationen handelte. Um klar definierte Bedingungen zu haben, wurde beschlossen, die Auswertung der Fluoreszenz der Beads ausschließlich auf die Singletts zu beschränken. Wie in Abb. 3.1.4 A zu sehen, wurde um die Singletts eine Region gelegt und die in den Abb. 3.1.4 B und C gezeigten Messungen wurden auf diese Region bezogen. Es wurden 10000 Ereignisse in dieser Region gezählt.

Die Einstellungen im Histogramm der FL-1 Messung waren mit unbeladenen Beads so gewählt worden, dass die Ereignisse im Bereich zwischen 10^0 und 10^1 lagen. Dieser Bereich wurde als negativ definiert. Die Abb. 3.1.4 B zeigt den Histogramm-Plot der Negativkontrolle, bei der der α -HPV16E7 Antikörper weggelassen worden war. Es zeigte sich ein einzelner breiter Peak, der im als negativ definierten Bereich lag. Somit zeigte die Negativkontrolle keine unspezifische Färbung. Abb. 3.1.4 C zeigt den Histogramm-Plot der vollständig angefärbten Probe. Es fand sich eine Anfärbung der Beads, die als positiv bewertet werden konnte. Die Fluoreszenzstärke der Beads erstreckte sich über einen weiten Bereich mit einem Peak im Bereich von 10^2 , der vermutlich durch maximal mit Protein beladene Beads erzeugt wurde. Ein weiterer Teil der Beads war unvollständig mit Protein beladen. Dieses Experiment zeigte, dass es möglich war, die Talon Beads in der beschriebenen Weise spezifisch anzufärben. Allerdings war die Anfärbung der Beads nicht einheitlich. Dafür kamen verschiedene Gründe in Frage. Die Beladung der Beads mit Protein könnte unvollständig sein, da die Konzentration der Proteinlösung, die Beladungsdauer oder andere Bedingungen nicht optimal waren. Die Verdünnungen der verwendeten Antikörper bzw. ihre Inkubationszeiten boten ebenfalls noch Optimierungspotential.

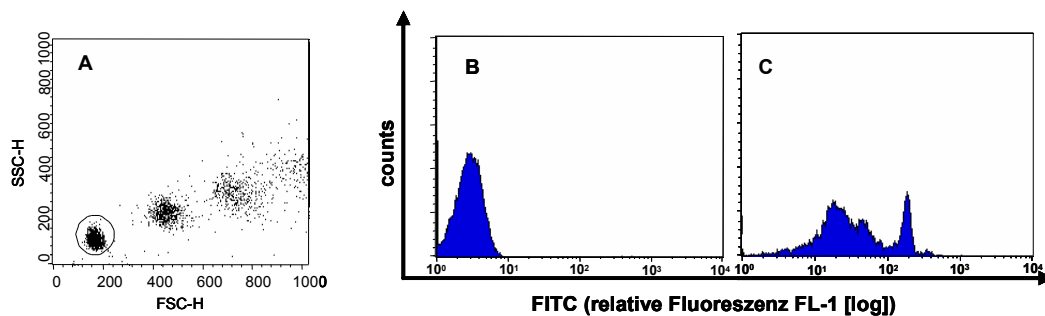


Abb. 3.1.4: Darstellung der FACS-Analyse von Talon Beads. Die angefärbten Beads wurden im Durchflusszytometer vermessen. A: Dot-Plot, B: Histogramm-Plot der Negativkontrolle HPV16E7WT beladene Beads angefärbt ohne Zugabe von NM2, C: Probe mit NM2

3.1.4 Optimierung der Beladung der Talon Beads mit Protein

Das in Abb. 3.1.4 dargestellte Experiment hatte gezeigt, dass die Talon Beads nach dem zunächst verwendeten Protokoll wahrscheinlich noch nicht mit Protein gesättigt waren. Es wurde eine Reihe von Experimenten durchgeführt, die eine maximale Beladung mit Antigen ermöglichen sollten. Zur Optimierung wurde dasselbe System wie in Kapitel 3.1.3 verwendet. Als spezifischer Antikörper wurde der monoklonale Maus α -HPV16E7-Hybridomüberstand NM2 unverdünnt eingesetzt um die Beladung der Beads mit HPV16E7WT und -SH zu überprüfen und das gleiche Detektionssystem verwendet. Für das Protein HPV18E7 stand kein Antikörper zur Verfügung.

3.1.4.1 Titration der Proteinkonzentration

Der erste Faktor, der variiert wurde, war die Konzentration der Proteinlösung, in dem die Beads beladen wurden. Die übrigen ursprünglichen Versuchsbedingungen blieben unverändert. Die Beads wurden mit HPV16E7WT und -SH beladen. Es wurde jeweils nativ aufgereinigtes Protein und in 8M Harnstoff denaturiert aufgereinigtes Protein zur Beladung verwendet. Zur Auswertung des Experiments wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (mean all) herangezogen. Dieser relative Wert beschreibt das Mittel der Fluoreszenzstärken aller gemessenen Ereignisse einer Probe. Es zeigte sich, dass bei einer Proteinkonzentration von 10 μ g/ml die mittlere Fluoreszenzintensität der Talon Beads höher war, als bei den höheren Konzentrationen (Abb. 3.1.5).

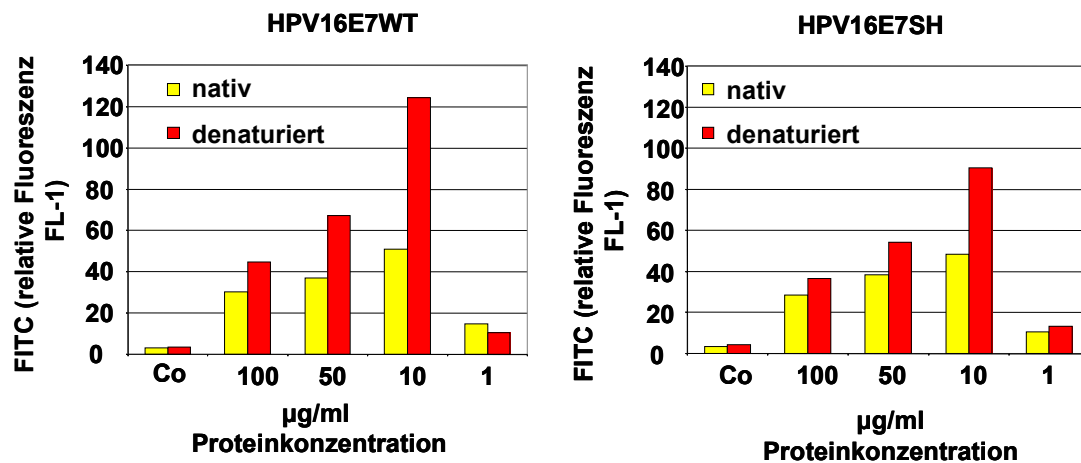


Abb. 3.1.5: Titration der Proteinkonzentration zur Beladung der Talon Beads und Vergleich der Beladungseffizienz mit nativem und mit Harnstoff-denaturiertem Protein

Es war ebenfalls zu sehen, dass die Beads in höheren Proteinkonzentrationen zu starker Verklumpung neigten und im Durchflusszytometer schlecht messbar waren. Im Dot-Plot zeigte sich keine distinkten Populationen (Abb. 3.1.4 A). Das FACS-Gerät konnte auf Grund der Verklumpungen die Ereignisse nicht korrekt zählen. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass es bei den höheren Proteinkonzentrationen zu Wechselwirkungen zwischen den Beads kommt. Eine Proteinkonzentration von 10 µg/ml war die am besten geeignete Konzentration zur Beladung der Beads. Für E7WT konnte eine relative mittlere Fluoreszenz von etwa 120 und für E7SH von etwa 90 erreicht werden. Es war allerdings nicht möglich die Beads so zu beladen, dass nur ein Peak im Histogramm-Plot entstand, d.h. die Beads einheitlich beladen waren (s. Abb. 3.1.6). Beim Vergleich der Histogramme (s. Abb.en 3.1.4 und 3.1.6 linkes Histogramm) zeigte sich allerdings eine Verbesserung der Beladung gegenüber dem Vorversuch, wenn denaturiertes Protein verwendet wurde. Denaturiertes Protein eignete sich besser als natives zur Beladung der Beads (Abb. 3.1.5 und 6). Bei einer Proteinkonzentration von 10 µg/ml wurden zwei- bis dreimal so hohe Mean-Werte erreicht, da wahrscheinlich die Zugänglichkeit des His-Tags bei denaturiertem Protein besser ist.

Es war prinzipiell eher wünschenswert, die Beads mit nativem Protein zu beladen, da bei denaturiertem Antigen konformationsabhängige Antikörper nicht binden können und es somit zu Sensitivitätsverlust kommen könnte. Daher wurde dieses Experiment mehrfach mit einigen Variationen wiederholt. Weder eine Verlängerung der Bindungszeit noch eine Bindung bei 4°C verbesserten die Bindung von nativem Protein an die Talon Beads. Da aber eine vollständige Beladung der Beads mit Protein als notwendig für eine Quantifizierung der Ergebnisse angesehen wurde, wurde beschlossen, in weiteren Experimenten mit dem denaturierten Protein zu arbeiten.

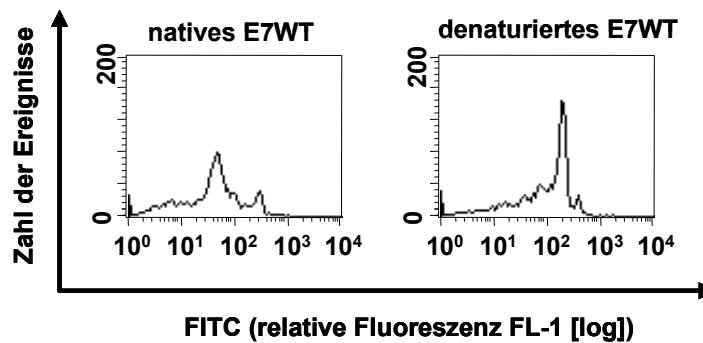


Abb. 3.1.6 Histogramm-Plots der mit einer Proteinkonzentration von 10 µg/ml beladenen Beads.

3.1.4.2 Kinetik der Proteinbeladung

Um die optimale Inkubationsdauer für die Proteinbindung an die Talon Beads zu finden, wurde eine Kinetik über 24 h aufgenommen. Die Beads wurden wie bisher beschrieben mit HPV16E7WT und –SH beladen. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde eine Probe entnommen, gewaschen und bei 4°C gelagert. Nach 24 h wurden alle Proben gemeinsam nach der beschriebenen Prozedur angefärbt und vermessen.

Die beiden Proteine zeigten unterschiedliche Bindungskinetiken an die Talon Beads (Abb. 3.1.7). HPV16E7WT beladene Beads hatten nach 30 min eine sehr hohe relative Fluoreszenz, die an späteren Zeitpunkten wieder abnahm. Dieses Ergebnis wurde in zwei Wiederholungen bestätigt. Nach 8 h Beladung wurde der maximale Wert erreicht, allerdings störten hier verklumpte Beads die korrekte Messung am FACS. Nach 24 h waren die Beads so verklumpt, dass eine Messung der Fluoreszenz nicht mehr möglich war. Für HPV16E7WT war eine Beladungszeit von 30 min ausreichend. Die mit E7SH beladenen Talon Beads zeigten erst nach 24 h die maximale Fluoreszenzintensität.

Da die verschiedenen Proteine unterschiedliche Bindungskinetiken haben, ist es notwendig, diese für jedes Protein zu bestimmen. Die Beladung der Talon Beads mit Protein wurde von nun an für HPV16E7WT 30 min und für HPV16E7SH 24 h durchgeführt.

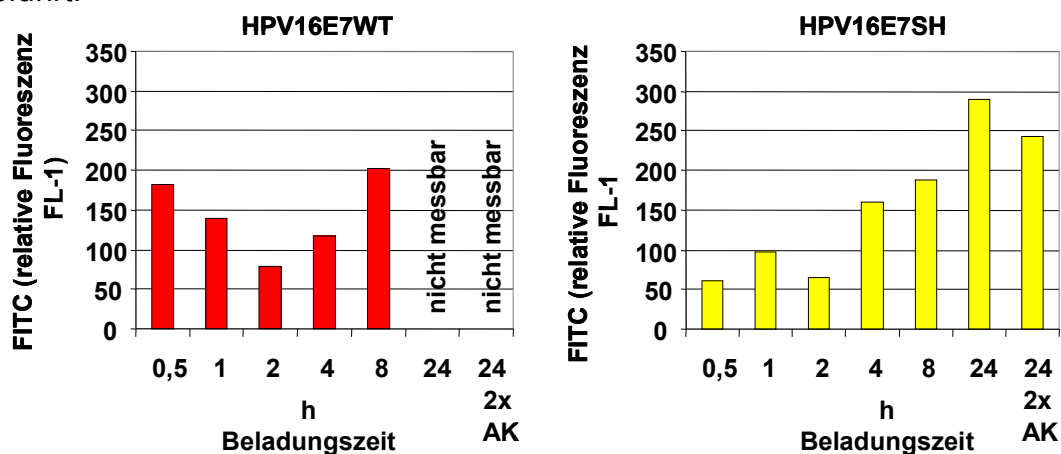


Abb. 3.1.7: Kinetik der Beladung der Talon Beads mit HPV16E7WT und –SH. Die Kinetik wurde

über 24 h aufgenommen und zum gleichen Zeitpunkt angefärbt.

Damit sichergestellt werden konnte, dass die zur Anfärbung verwendeten Antikörper nicht limitierend sind wurden die 24 h-Proben zusätzlich mit der doppelten Menge (2x AK) Antikörper angefärbt.

3.1.4.3 Mechanische Beladungsbedingungen

Die Herstellerangaben für die Beladung von Beads mit Protein empfehlen ein langsames Schütteln der Beads während der Inkubation mit der Proteinlösung. Daher waren die Beads zur Beladung auf einem Wipptisch geschwenkt worden. Im folgenden Experiment wurde überprüft, ob stärkeres Schütteln der Beladungsansätze bessere Ergebnisse brachten. Die Beladung der Beads wurde wie bisher beschrieben vorbereitet. Im Unterschied zu den vorherigen Versuchen wurde ein Teil der Beads wie bisher während der Inkubation mit der Proteinlösung auf dem Wipptisch geschwenkt, während ein anderer Teil bei 500 rpm und 1200 rpm mit einem Thermomixer geschüttelt wurde. Die Beads wurden wie beschrieben gefärbt und am FACS vermessen. Wie in Abb. 3.1.8 zu sehen, zeigten sich große Unterschiede von bis zu 100% in der Fluoreszenzintensität der Beads bei den verschiedenen Schüttelstärken.

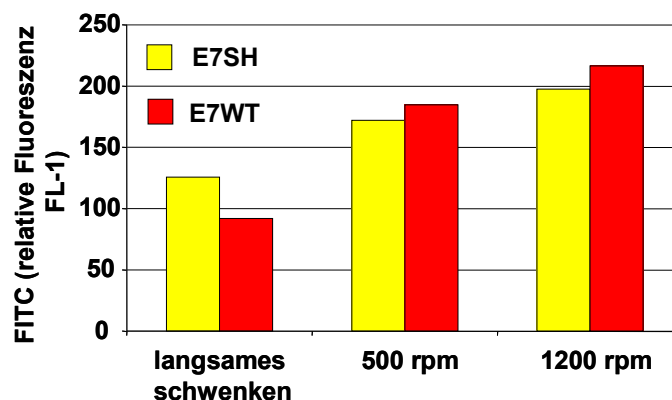


Abb. 3.1.8: Variation der mechanischen Beladungsbedingungen zur Beladung der Talon Beads mit HPV16E7WT und -SH

Je stärker die Beads während des Beladungsvorgangs geschüttelt wurden, desto höhere Fluoreszenz als Maß für die Antigenbeladung wurde gemessen. Während die langsam geschwenkten Beads nach der Anfärbung nur relative mittlere Fluoreszenzintensitäten von 90 bzw. 120 erreichten, konnten durch Schütteln bei 500 rpm bereits Intensitäten von etwa 170 und 180 erreicht werden. Wurden die Beads bei einer Geschwindigkeit von 1200 rpm geschüttelt, lag die mittlere Fluoreszenzstärke bei über 200. Diese Ergebnisse wurden in mehrfachen Wiederholungen bestätigt.

Bei der Betrachtung der Histogramm-Plots der FACS-Analyse (Abb. 3.1.9, Beispiel E7WT) wurde deutlich, dass durch schütteln bei 1200 rpm die Beladung der Talon Beads mit Protein entscheidend verbessert wurde. Die Beads waren nun einheitlich angefärbt. Im

Histogramm war ein klarer Einzelpeak zu finden.

Damit war es gelungen, die Beladung der Talon Beads für diese Antigene so zu optimieren, dass von einer vollständigen Sättigung der Beads mit Protein ausgegangen werden konnte. Das Protokoll zur Beladung der Talon Beads mit aufgereinigtem HPV16E7WT (Proteinkonzentration 10 µg/ml, Beladungszeit 30 min bei 1200 rpm) und HPV16E7SH (Proteinkonzentration 10 µg/ml, Beladungszeit 24 h bei 1200 rpm) war somit erstellt.

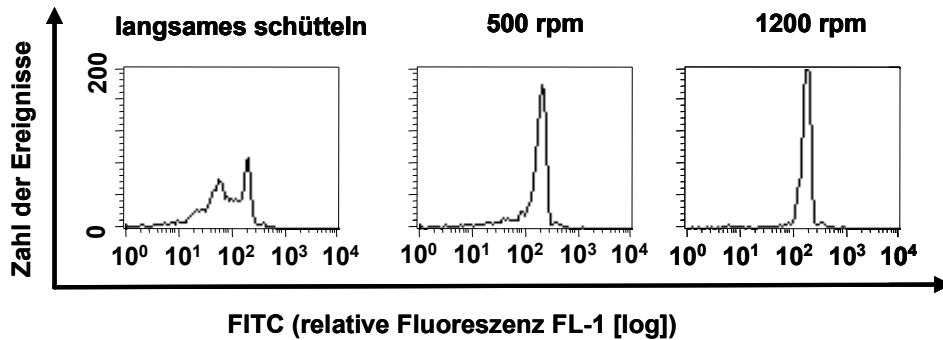


Abb. 3.1.9: Histogramm-Plots der Beadsbeladung bei Variation der Schüttelstärke für HPV16E7WT

3.1.4.4 Beladung der Beads mit Protein aus dem Bakterienlysat

Die bisherigen Experimente waren mit aufgereinigtem denaturiertem Protein durchgeführt worden. Um die Methode zu vereinfachen, sollten die Talon Beads direkt aus dem Bakterienlysat beladen werden, so dass der Arbeitsschritt der Proteinaufreinigung entfallen konnte. Kulturen der Klone von pQE9HPV16E7WT und -SH wurden wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben induziert und die Bakterienzellen nach 4 h Induktion geerntet. Die erfolgreiche Induktion der Proteinexpression wurde in einer SDS-PAGE überprüft. Die Zellen wurden in einer Dichte von 5 ml W+B-Puffer mit 8 M Harnstoff pro Gramm Feuchtgewicht aufgenommen, durch 20 min Schwenken bei Raumtemperatur lysiert, die meisten Bestandteile abzentrifugiert und die Gesamtproteinkonzentration bestimmt. Da in Abschnitt 3.1.4.1 festgestellt worden war, dass die Proteinkonzentration ein wesentlicher Faktor für die Beladung der Talon Beads mit Protein war, wurde eine Konzentrationsreihe erstellt. Das Lysat wurde dafür mit W+B-Puffer mit 8 M Harnstoff verdünnt. Pro 20 µg Beads wurden 100 µl Zelllysate eingesetzt. Das beste Ergebnis wurde bei einer Gesamtproteinkonzentration von 1 mg/ml erzielt (Abb. 3.1.10). Die Histogramme der FACS-Analyse zeigten (Abb. 3.1.11 für HPV16E7WT, -E7SH war vergleichbar), dass bei dieser Konzentration die Beads vollständig beladen sind. Es konnte also gezeigt werden, dass es möglich ist, die Talon Beads direkt aus dem Proteinlysat zu beladen und damit die Durchführung der Methode entscheidend zu vereinfachen.

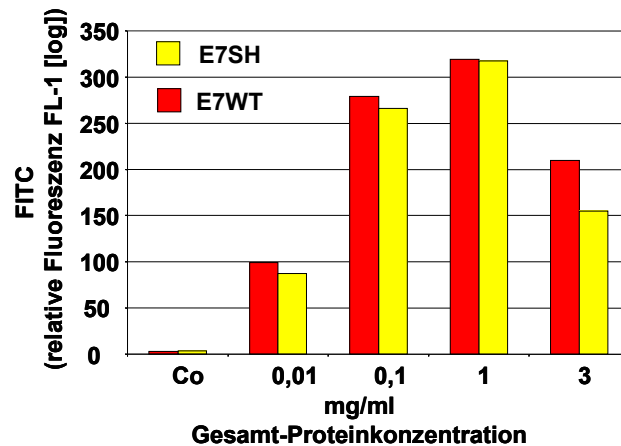


Abb. 3.1.10: Beladung der Beads aus Bakterienlysats für die Proteine HPV16E7WT und –SH

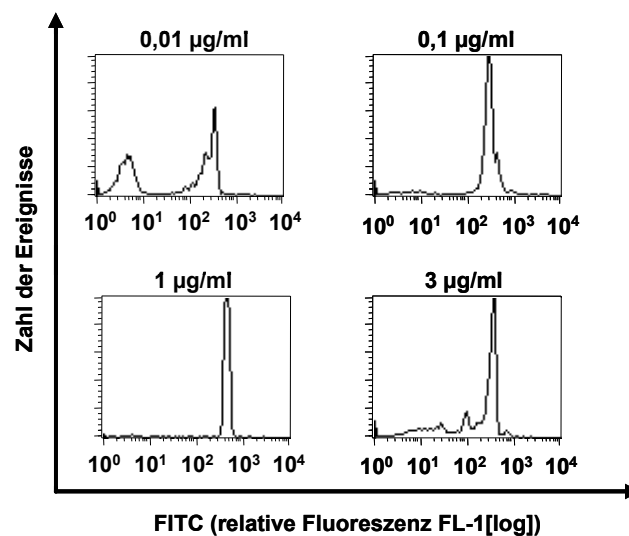


Abb. 3.1.11: Histogramm-Plots der Beladung der Talon Beads direkt aus dem Bakterienlysats für HPV16E7WT. Die Konzentrationen des zur Beladung eingesetzten Lysats stehen über dem jeweiligen Histogramm.

3.1.5 Austesten des Nachweisantikörpers anhand von Patientenseren

Nachdem die Bedingungen zur optimalen Beladung der Talon Beads mit Protein, eine Meßmethode am Durchflußzytometer und die Rahmenbedingungen zur Durchführung der Antikörperfärbung mit Hilfe der Proteine HPV16E7WT und –SH, sowie mit dem α -HPV16E7 Maus-Erstantikörperüberstand NM2 und einem direkt FITC-markierten Ziege α -Maus Antikörper etabliert worden waren, sollte das Meßsystem nun anhand von drei charakterisierten Patientenseren überprüft werden. Es stand ein stark mit HPV16E7 reagierendes Serum (Pt 10 KG), ein stark mit HPV18E7 reagierendes Serum (Pt 32 BM) und ein weder mit HPV16E7 noch HPV18E7 reagierendes Serum (AMK) zur Verfügung. Die Beads wurden, wie oben beschrieben, mit den aufgereinigten Proteinen HPV16E7WT und –SH beladen. Pro Reaktion wurden 12 µg proteinbeladene Beads eingesetzt. Sie wurden für 90 min in dem gegebenenfalls mit W+B-Puffer verdünnten Serum bei 1200

rpm geschüttelt und anschließend dreimal in W+B gewaschen. Als Zweitserum wurde ein FITC-markierter Kaninchen α -human IgA+IgG+IgM (H+L) (Jackson ImmunoResearch) verwendet. Das Antiserum wurde 1:100 in W+B verdünnt und für 1 h mit den Beads bei 1200 rpm inkubiert. Es wurde eine Verdünnungsreihe aller drei Seren vermessen (s. Abb. 3.1.12).

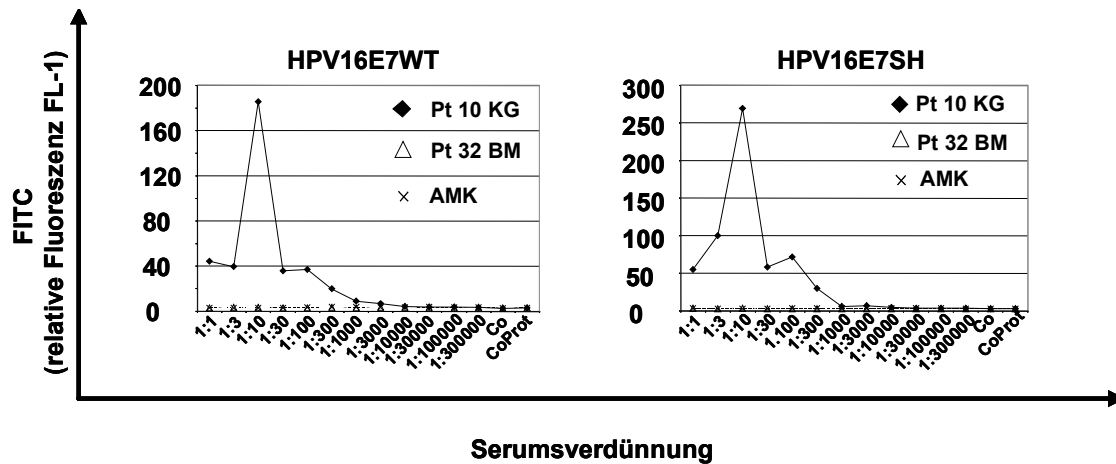


Abb. 3.1.12: Seren bekannter Spezifität (Pt 10KG, HPV16E7; Pt 32BM, HPV18E7; AMK, negativ) wurden 1:3 titriert und die Reaktivität im Talon ELISA bestimmt.

Das mit HPV18E7 positiv reagierende Serum Pt 32BM zeigt keine Kreuzreaktion mit HPV16E7WT oder -SH, ebenso wie das Serum AMK. Beide Seren zeigen bei allen Verdünnungen nur mittlere Fluoreszenzwerte um 3 MFI (mean fluorescence intensity). Mit beiden rekombinanten Proteinen konnten HPV16E7-spezifische Antikörper in dem als mit HPV16E7 positiv reagierend charakterisierte Serum Pt 10 KG nachgewiesen werden. Wurde das Serum Pt 10KG nur schwach verdünnt (1:1 und 1:3) waren die gemessenen Mean-Werte erheblich niedriger, als bei einer 1:10 Verdünnung. Im Verlauf der Färbung war darüber hinaus aufgefallen, dass die Beads in den Messansätzen mit schwach verdünntem Serum stark verklumpten. Beides konnte in mehreren Wiederholungen reproduziert werden.

Wie bei der Proteinbeladung der Beads musste also auch bei der Anfärbung darauf geachtet werden, dass die Talon Beads nicht zu hohen Proteinkonzentrationen ausgesetzt wurden, da sich sonst die mechanischen Eigenschaften sehr ungünstig veränderten. Bei der Verdünnung 1:10 wurden bei den Messungen die insgesamt höchsten Zahlenwerte gefunden. Bei stärkeren Verdünnungen nahmen die gemessenen MFI-Werte wieder ab. Für beide Proteine konnte man anhand der Verdünnungskinetik feststellen, dass eine Serumverdünnung bis etwa 1:300 bei diesem Serum noch etwa zehnmal höhere MFI-Werte messbar machte, als sie in den beiden Negativkontrollen gefunden wurden. Die bei einer Verdünnung von 1:100 gemessenen MFI-Werte für dieses

Serum lagen bei 40 bzw. 60. Da das Serum Pt 10KG als stark HPV16E7 positiv bekannt war, musste angenommen werden, dass weniger stark reagierende Seren nicht mehr erfasst werden konnten. Es war also notwendig, die Sensitivität dieses Assays zu erhöhen, um einen effizienten Antikörnernachweis möglich zu machen.

3.1.6 Optimierung der Sensitivität

Um eine höhere Sensitivität für den Nachweis von spezifischen Antikörpern zu erreichen wurden anhand des Serums Pt 10KG drei verschiedene Nachweisantikörper ausgetestet. Zum einen ein RPE-konjugierter (im FL-2 Kanal messbar) und ein Alexa-konjugierter (im FL-1 Kanal messbar) α -human IgA+IgG+IgM (H+L) Antikörper. Die beiden getesteten Farbstoffe haben eine hellere Fluoreszenz, so dass ein stärkeres Signal zu erwarten war. Als zweite Möglichkeit der Signalverstärkung wurde ein Nachweissystem bestehend aus einem Ziege α -human Biotin-SP-conjugated IgA+IgG+IgM (H+L) Antikörper und einer anschließenden Färbung mit einem Streptavidin RPE -Konjugat getestet. Die direkt anfärbenden Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:100 und der biotinmarkierte Antikörper, sowie das Streptavidin RPE-Konjugat in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet.

Mit dem bisher verwendeten FITC-markierten Antikörper wurden mit dem Serum Pt 10 KG bei einer Serumverdünnung von 1:10 eine mittlere Fluoreszenzstärke von etwa 180 MFI gemessen. Bei 1:100 wurde etwa 40 MFI erreicht. Mit dem RPE-markierten Antikörper waren bei einer Verdünnung von 1:20 392 MFI und bei 1:100 178 MFI messbar. Mit diesem Antikörper konnte die Sensitivität folglich gesteigert werden (Abb. 3.1.13).

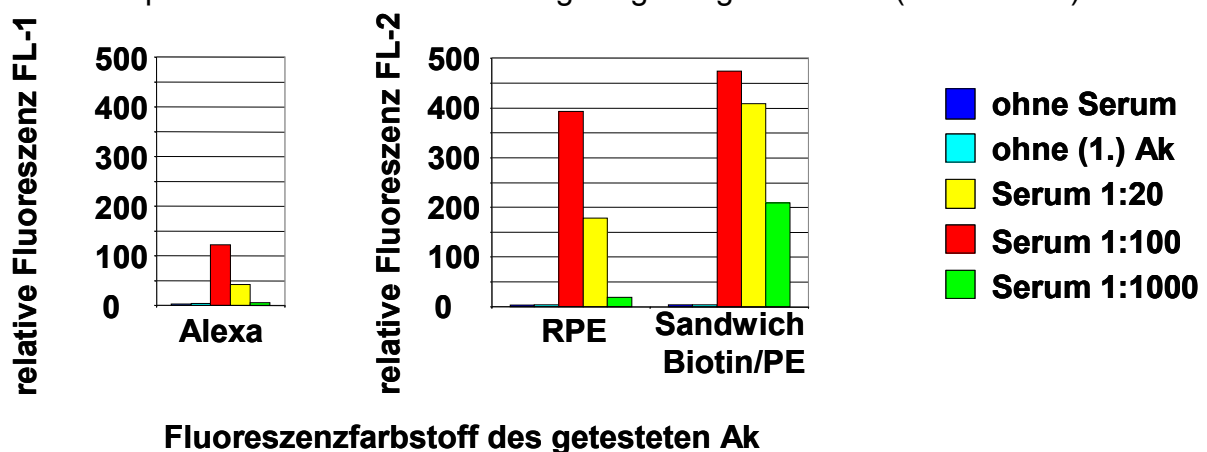


Abb. 3.1.13: Ergebnis der Austestung drei verschiedener Nachweissysteme zur Erhöhung der Sensitivität des Antikörnernachweises. Es wurde das schon in Abschnitt 3.1.6 eingesetzte Serum Pt 10 KG verwendet. Jedes Nachweissystem wurde mit drei verschiedenen Serumkonzentrationen getestet. Die Beads waren mit E7WT beladen.

Der Alexa-markierte Antikörper brachte bei 1:20 lediglich 122 MFI und bei 1:100 42 MFI und ist damit nicht besser als der FITC-markierte Kaninchen α -human Antikörper, der im

vorhergehenden Experiment verwendet wurde (Abb. 3.1.12). Eine deutliche Verbesserung ist mit dem Biotin/Streptavidin-RPE-System zu erreichen. Bei einer Verdünnung des Serums Pt 10 KG auf 1:20 liegt der gemessene Wert bei 474 MFI und bei 1:100 immerhin bei 407 MFI. Selbst bei einer Verdünnung von 1:1000 konnte noch eine Fluoreszenzintensität von 208 MFI gemessen werden. Die anderen getesteten Nachweissysteme erzeugten bei dieser Verdünnung Fluoreszenzintensitäten, die wenig über den Messwerten der Negativkontrollen lagen. Das Biotin/Streptavidin-RPE-Nachweissystem zeigt darüber hinaus keine unspezifische Anfärbung der mit Protein beladenen Beads. Wurden die Beads ohne Serum inkubiert, oder der biotin-markierte Antikörper weggelassen, wurden Werte für die mittlere Fluoreszenz gemessen, die zwischen 3 und 5 MFI lag. Dies liegt im Bereich der Negativkontrolle. Der Test der verschiedenen Antikörper wurde zweimal unabhängig mit dem gleichen Ergebnis reproduziert. Da das Biotin/Streptavidin-RPE-Nachweissystem bei weitem die überzeugendste Steigerung der Sensitivität der Messung brachte, wurde beschlossen, es in den folgenden Messungen zu verwenden, und dabei eine Serumverdünnung von 1:100 einzusetzen.

3.1.7 Validierung der Methode anhand einer Serensammlung bekannter Spezifität

Nachdem in den vorhergehenden Abschnitten des Kapitels 3.1 die Methode des Talon ELISA aufgebaut und die einzelnen Arbeitsschritte entwickelt und optimiert wurden, soll die Methode anhand einer Sammlung von 100 Seren bekannter Reaktivität validiert und statistisch bestätigt werden. Diese Sammlung, die auch bei der Entwicklung einer auf dem Multiplex-System basierenden Methode zum Einsatz kam (Waterboer et al., 2005), bestand aus 39 HPV16E7-Antikörper positiven, 40 HPV18E7 Antikörper positiven und 20 für beide Antikörper negativen Seren. Alle Seren wurden in der oben beschriebenen Weise in unabhängigen Experimenten zweimal in einer Verdünnung von 1:100 vermessen. Jedes Serum wurde mit Proteinen HPV16E7WT, -SH und HPV18E7 auf das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern untersucht. Bei der statistischen Auswertung wurde zum einen über die Interassay-Korrelationsanalyse die Reproduzierbarkeit der Messwerte überprüft. Mit Hilfe einer κ -Analyse wurden die Messdaten mit den Ergebnissen der Luminexmethode verglichen, die freundlicherweise von Tim Waterboer (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt worden waren.

3.1.7.1 Interassay-Korrelation

Die für diese Korrelationsanalyse verwendeten Daten wurden aus an verschiedenen Tagen unabhängig voneinander durchgeführten Messungen gewonnen. Die zusammengehörigen Daten wurden in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen. Der Korrelationskoeffizient R^2 wurde mit Hilfe der Excel-Statistik aus den Ergebnissen der

Trendlinie ermittelt und gibt an, ob zwischen zwei Datenreihen ein lineares Verhältnis besteht. Ein Wert von 1 bedeutet hierbei vollständige Linearität. Werte bis 0,8 werden als sehr gute Korrelation und Werte bis 0,6 als gute Korrelation interpretiert. Für HPV16E7WT wurde eine sehr gute Interassay-Korrelation gefunden (Abb. 3.1.14). Der Wert für R^2 liegt bei 0,95. Wie man anhand der Grafik sehen kann, liegen fast alle Werte im Bereich der Trendlinie. Für E7SH ergibt sich ebenfalls eine sehr gute Korrelation. Der Wert liegt hier bei 0,9. Für HPV18E7 konnte ein guter Korrelationswert von 0,6 ermittelt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass die Messergebnisse in unabhängigen Messungen reproduzierbar sind.

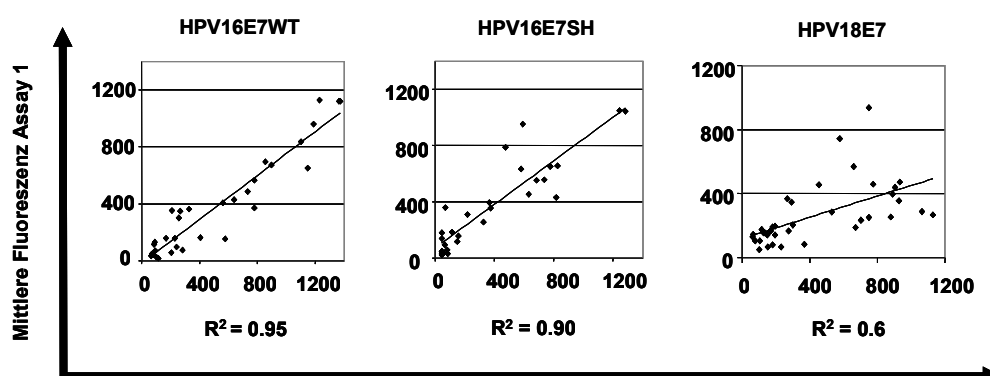


Abb. 3.1.14: Interassay-Korrelation für zwei unabhängige Messungen des Talon ELISA. Zur besseren Übersicht wurde eine Trendlinie in die Grafik gelegt der Korrelationskoeffizient R^2 wurde unterhalb der Grafiken angegeben.

3.1.7.2 Vergleich des Talon ELISA mit den Ergebnissen der Luminex-Methode mittels κ -Analyse

Für die κ -Analyse musste zunächst der cut-off (Grenzwert) bestimmt werden, um zu ermitteln welche Seren als positiv und welche als negativ zu bewerten waren. Dazu wurde der Mittelwert und die jeweilige Standardabweichung der negativen Seren für jedes Protein errechnet. Der dreifache Wert der Standardabweichung wird zum Mittelwert addiert. Dieser Zahlenwert wurde als cut-off festgelegt. Alle Seren, für die eine mittlere Fluoreszenz oberhalb dieses Wertes gefunden wurde galten als positiv, die darunter liegenden als negativ. Tab. 3.1.1 zeigt die Ergebnisse dieser Analyse.

Tab. 3.1.1: Ermittlung des cut-offs

	HPV16E7W T	HPV16E7S H	HPV18E7
MW ¹	29,26	19,67	35,90
sd ²	10,67	6,95	12,75
cut off	60,00	36,00	48,00

¹ Mittelwert

² Standardabweichung

Aufgrund der Messdaten der negativen Seren wurde für HPV16E7WT ein cut-off von 60 und für –E7SH ein cut-off von 36 ermittelt werden. Für HPV18E7 lag er bei 48.

Daraus ergab sich für die HPV16E7WT Messreihe, dass sieben im Luminexassay als HPV16E7 positiv bewertete Seren im Talon ELISA negativ waren, für –E7SH waren es neun und für HPV18E7 zwei. Für die κ -Analyse wurden die Werte in eine Vierfeldertafel eingeteilt. Die konkordant positiven und negativen Seren wurden oben rechts und untenlinks eingetragen, die Diskordanten in die anderen Felder (s. Abb. 3.1.15). Die Analyse wurde mit Hilfe eines Online-Rechenprogramms durchgeführt (www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1.cfm.)

Die aus der κ -Analyse ermittelten κ -Werte, sowie die Werte für das 95% *confidence interval* (ci) sind in der Abb. 3.1.15 angegeben.

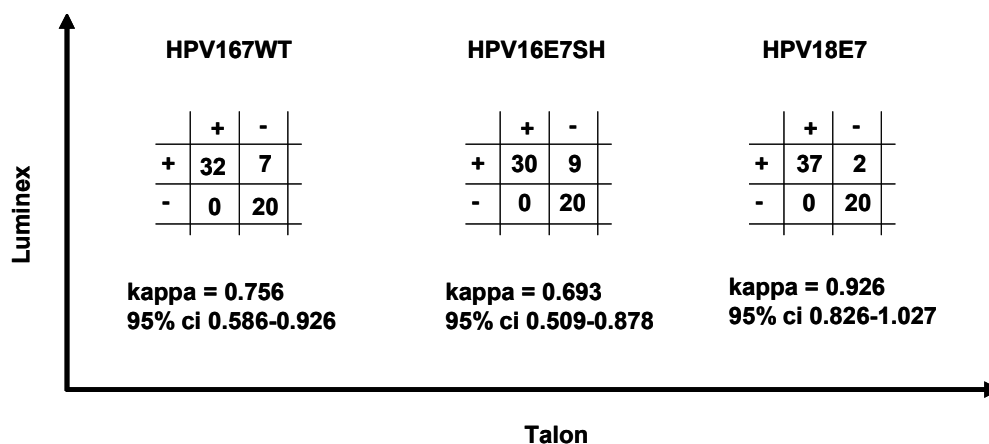


Abb. 3.1.15: Ergebnisse der κ -Analyse zum Vergleich von Talon ELISA und Luminexmethode. Die mit Hilfe eines Online-Rechenprogramms ermittelten κ -Werte, sowie der ci-Wert wurden unter den Grafiken angegeben.

Für die Bestimmung der spezifischen Antikörper von HPV16 mit den an die Beads gebundenen Proteinen HPV16E7WT und –SH ergibt sich eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des Talon ELISA und der Luminexmethode. Für den Nachweis von HPV18E7 kann das Ergebnis als sehr gute Übereinstimmung gewertet werden.

Die Methode des Talon ELISA ist insgesamt weniger sensitiv als die zum Vergleich herangezogene Luminexmethode. Stark positive Seren werden sehr gut detektiert. Seren, die in der Luminexmethode schwach positiv waren, sind im Talon ELISA negativ. Der wichtigste Grund für die im Vergleich zur Luminexmethode herabgesetzte Sensitivität des Talon ELISA liegt sicher darin begründet, dass hier denaturiertes Protein als Antigen verwendet wurde. Trotzdem zeigt sich anhand der gewonnen Daten und den Ergebnissen der Statistik, dass der Talon ELISA eine geeignete Methode ist, Antikörper in Patientenseren nachzuweisen.

3.1.8 Messung von Patientinnenserum

Aus der „Tumorbank“ des Labors stand das Material von fünf Patientinnen zur Verfügung, die HPV16-positiv getestete Tumoren aufwiesen. Von diesem Material waren sowohl tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL), DC und Serum vorhanden.

Dieses Zellmaterial sollte sowohl serologisch im Talon ELISA als auch im Proliferationsassay und im INF- γ ELISpot vermessen werden.

Die Ergebnisse der zellimmunologischen Assays werden in Abschnitt 3.4 (s. Tab. 3.4.1 und 3.4.2) besprochen.

Zur Bestimmung des cut-offs wurden 3 als HPV16 negativ bekannte Seren in die Messungen einbezogen. Ein für die Messung irrelevantes Protein (HPV18E7) wurde zur Kontrolle der Spezifität genutzt, d. h. jedes Serum wurde auch auf die Reaktion mit diesem Protein getestet. Alle Messungen wurden in unabhängigen Messansätzen dreimal durchgeführt.

Tabelle 3.1.2: Ermittlung des cut-off

	MW ¹	sd ²	cut-off
negative Seren	9,16	3,72	12,88

¹ Mittelwert der MFI Werte aus sechs unabhängigen Messungen

² Standardabweichung

Tabelle 3.1.3: Bewertung der Patientenserum

	MW 16E7 ¹	MW 18E7 ²	Beurteilung ³
Pt 69	19,36	18,83	negativ
Pt 112	25,14	32,87	negativ
Pt 124	165,32	29,78	positiv
Pt 217	15,68	16,71	negativ
Pt 219	16,01	18,11	negativ

¹ Mittelwert der Patientinnenproben mit HPV16E7 beladenen Beads

² Mittelwert der Patientinnenproben mit HPV18E7 beladenen Beads als Negativkontrolle

³ Als positiv wurden Seren gewertet, deren mittlere Fluoreszenzwerte oberhalb des cut-offs lagen. Waren die Meanwerte der Messreihen mit dem Kontrollpeptid HPV18E7 höher als die für HPV16E7, wurde das Ergebnis als unspezifisch bewertet

In Tabelle 3.1.2 wurden die Daten zur Ermittlung des cut-offs dargestellt. Er liegt bei einer mittleren Fluoreszenz von 12.88. Alle Seren, für die eine mittlere Fluoreszenz oberhalb dieses Wertes ermittelt wurde sollten somit als positiv gelten. Allerdings musste festgestellt werden, dass die mittleren Fluoreszenzen die für dass als Kontrolle verwendete Protein HPV18E7 ermittelt

wurden, bei vier der fünf vermessenen Seren höher lagen (Pt 112, 217 und 219), bzw. vergleichbar hoch (Pt 69), als die für HPV16E7. Dies bedeutete, dass diese Seren als unspezifisch reagierend zu beurteilen waren. Das Serum von Pt 124 zeigt eine positive Reaktion auf HPV16E7-Protein.

3.2 *In vitro* Experimente zur pTHamp-HPV16E7SH DNA Vakzine

Es war gezeigt worden, dass die DNA-Vakzine pTHamp-E7SH im Maussystem eine spezifische CTL-Antwort auslösen kann (s. Abschn. 1.3.2). Diese Ergebnisse sollten auf das Humansystem übertragen werden. Mittels *in vitro* Untersuchungen sollte gezeigt werden, ob die Induktion einer Immunantwort auch in einem humanen Zellsystem möglich ist. Da zum Zeitpunkt der Arbeit keine Methode zur Verfügung stand, die es ermöglichte, dendritische Zellen, die in dem gewählten Zellsystem als Antigen präsentierende Zellen fungieren, effizient mit DNA zu beladen, musste die notwendige Methodik zunächst entwickelt werden.

3.2.1 Optimierung der Transfektion von dendritischen Zellen mit DNA mittels Amaxa-Technologie

Dem *Human Dendritic Cell Nucleofector Kit* der Firma Amaxa ist ein optimiertes Protokoll beigelegt, dass die effiziente Transfektion von dendritischen Zellen ermöglichen soll. Frisch generierte DC wurden gemäß dem Herstellerprotokoll mit 5 µg pCMV-EGFP transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde anhand der grünen Fluoreszenz der DC im Durchflusszytometer ermittelt. Zur Beurteilung der Viabilität wurden die Zellen mit Propidiumjodid gefärbt. Als erfolgreich transfiziert galten DC, die zum einen grün fluoreszierten (EGFP-positiv) und zum anderen nicht durch Propidiumjodid angefärbt wurden. Das Ergebnis wurde in einem Dot-Plot als Prozent EGFP-positiver und gleichzeitig Propidiumjodid-negativer Zellen dargestellt. Die Entwicklung wurde über 48 h verfolgt. In Abb. 3.2.1 wird ein Dot-Plot gezeigt, in dem die Transfektionseffizienz nach 24 h dargestellt ist. Es wurden dabei Transfektionseffizienzen zwischen 0% und 11% erreicht. Mehrfache Wiederholungen des Experiments führten zum gleichen Ergebnis. Diese Effizienzen wurden als zu niedrig für einen erfolgreichen Einsatz von DC als Stimulatoren eingeschätzt.

3.2.1.1 Ermittlung des optimalen Transfektionsprogramms

Da mit dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll (Transfektionsprogramm U-2) keine ausreichenden Transfektionseffizienzen erreicht werden konnten, wurden nach Rücksprache mit der Firma Amaxa andere Transfektionsprogramme getestet (Programm U-4, U-7, U-9, U-15 und U-20) und mit dem von der Firma Amaxa für DC-Transfektion empfohlenen Programm U-2 verglichen (Abb.3.2.1). Die übrigen Bedingungen wurden beibehalten. Mit dem Programm U-2 transfizierte DC zeigen eine sehr gute Viabilität. In diesem Experiment waren 11% der DC sehr

schwach EGFP-positiv. Wurden andere Programme verwendet, war die Überlebensrate der DC deutlich schlechter. Es wurden zum Teil bessere Transfektionseffizienzen und vor allem auch eine stärkere EGFP-Expression erreicht. Die Transfektion mit dem Programm U-7 brachte die besten Ergebnisse. Bei einer Überlebensrate von 56% der eingesetzten DC wurde eine Transfektionseffizienz von 26% erzielt. Dieses Programm wurde bei den weiteren Optimierungsschritten zur Transfektion der DC eingesetzt.

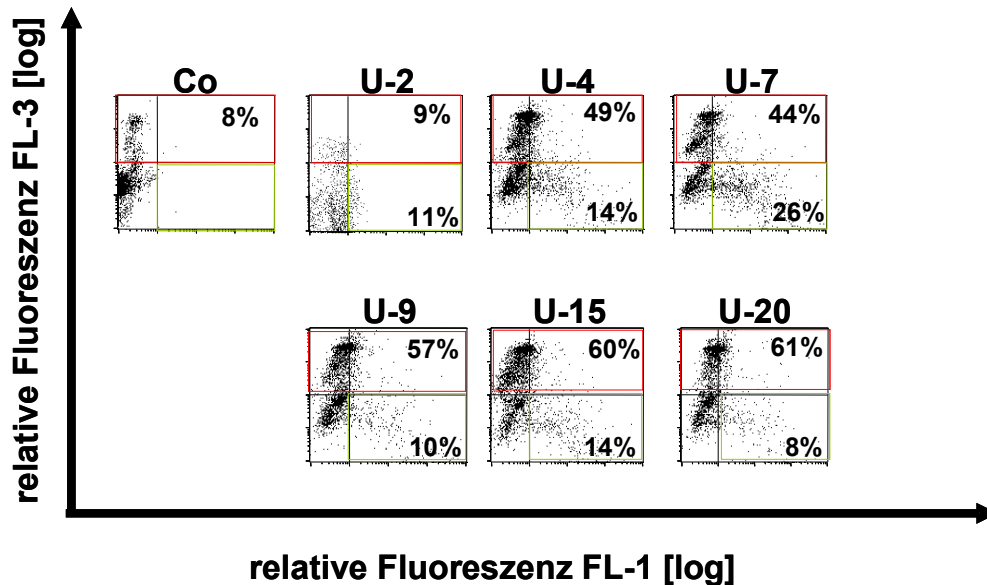


Abb. 3.2.1: Transfektionsoptimierung durch Variation des Transfektionsprogramms: Zur Suche des optimalen Transfektionsprogramms wurden 1×10^6 DC mit $5 \mu\text{g}$ EGFP-DNA mit den oben genannten Programmen transfiziert. Nach 24 h wurden die DC mit Propidiumjodid (PJ) angefärbt und die Viabilität, sowie die Transfektionseffizienz am FACS ermittelt. Rot markiert sind die toten Zellen. Die EGFP-positiven und lebenden Zellen wurden mit einem grünen Kasten gekennzeichnet. Die Zahlen in den Kästchen geben die Prozente der in den Bereichen befindlichen DC an.

3.2.1.2 Ermittlung der optimalen DNA-Menge

Die Optimierung der DNA-Menge ist ein wichtiger Faktor für eine effiziente Transfektion. Hohe DNA-Mengen führen zu höherer Expression, aber auch zu schlechterer Viabilität der transfizierten DC. Das im Folgenden beschriebene Experiment sollte darüber hinaus Aufschluss über den zeitlichen Verlauf der EGFP-Expression in DC geben. Ziel war es, den Zeitrahmen zu ermitteln, der für den Einsatz der DC als Stimulatoren besonders günstig ist.

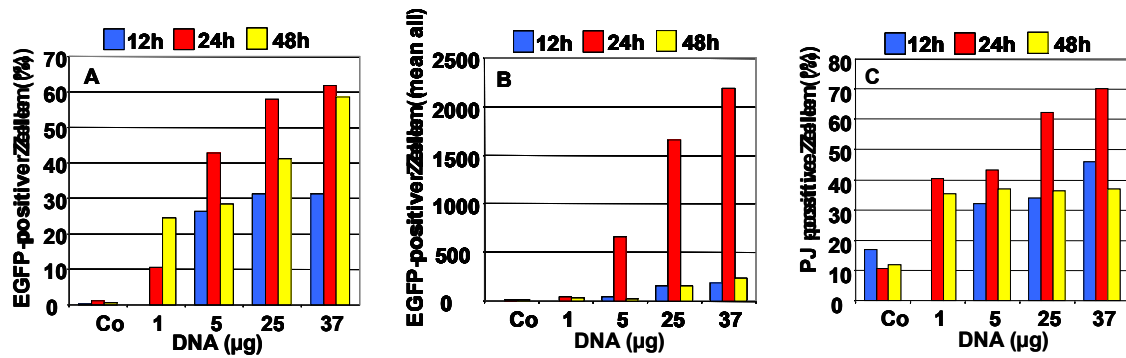


Abb. 3.2.2: Ermittlung der optimalen DNA-Menge zur Transfektion von DC. Die DC wurden mit unterschiedlichen Mengen pCMV-EGFP transfiziert. 12, 24 und 48h nach der Transfektion wurden die Zellen mit PJ angefärbt und im Durchflusszytometer EGFP-Expression und Viabilität vermessen.

Frisch generierte DC wurden mit verschiedenen DNA-Mengen zwischen 1 µg und 37 µg nach dem bisher entwickelten Protokoll mit Programm U-7 transfiziert. Zur Auswertung wurden folgende Parameter herangezogen: Der prozentuale Anteil an lebenden und EGFP exprimierenden Zellen, die mittlere Fluoreszenz (mean all) dieser Zellen, als Maß für die durchschnittliche Menge an produziertem Antigen pro Zelle und die Überlebensrate der transfizierten Zellen. Erwartungsgemäß nimmt die Zahl der EGFP-positiven Zellen mit zunehmender DNA-Menge zu (Abb. 3.2.2 A und B). Die maximal erreichte Transfektionseffizienz lag bei über 60%. Auch die mittlere Fluoreszenz der Zellen nahm erheblich zu. Bei hohen DNA-Mengen (25 bzw. 37 µg) nahm die Viabilität der Zellen jedoch stark ab (Abb. 3.2.2.C). Da die zur Verfügung stehende Menge an DC ein limitierender Faktor für die Durchführbarkeit der Experimente ist, musste ein Kompromiss zwischen einerseits guter Transfektionseffizienz und möglichst hoher Expressionsrate des transfizierten Antigens und andererseits guter Viabilität gefunden werden.

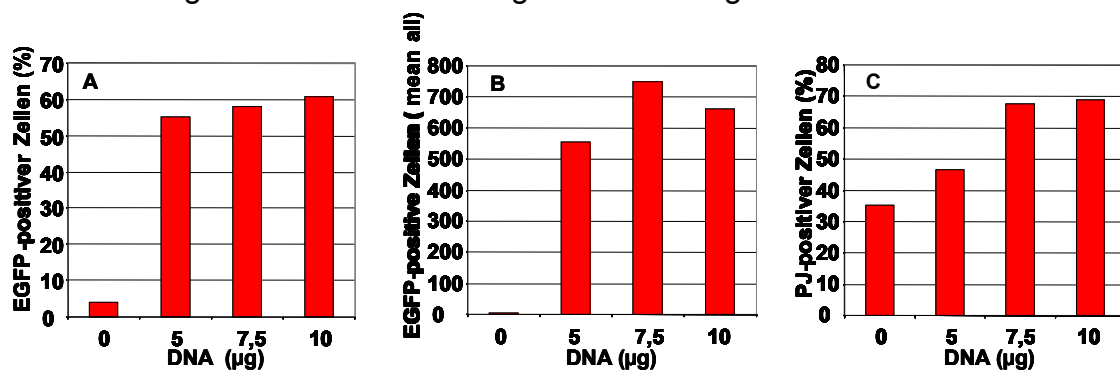


Abb. 3.2.3.: Feiner abgestufte Titration der DNA-Menge. Die Zellen wurden, wie beschrieben mit unterschiedlichen DNA Mengen transfiziert. Die Zellen wurden 24h nach der Transfektion mit PJ gefärbt und im Durchflusszytometer EGFP-Expression und Viabilität vermessen

Der Bereich zwischen 5 und 10 µg zur Transfektion eingesetzter DNA erschien unter der Berücksichtigung dieser Aspekte am besten geeignet. Im zeitlichen Verlauf der Antigenexpression findet man nach 24 h die höchste Zahl an EGFP exprimierenden

Zellen und die durchschnittlich höchste Antigenexpression in den DC. Es wurde beschlossen, DC 24 h nach der Transfektion als Stimulatoren einzusetzen.

Im Bereich zwischen 5 μg und 10 μg DNA pro Transfektionsansatz stieg die Transfektionseffizienz nur gering von 56% auf 61% (Abb. 3.2.3 A und B). Dafür wurden erheblich mehr PJ-positive DC gefunden, wenn mehr DNA eingesetzt wurde (Abb. 3.2.3.C). In den folgenden Versuchen wurden daher die DC mit 5 μg pro Transfektionsansatz transfiziert. Diese Ergebnisse wurden zweimal mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

3.2.1.3 Einfluss der zur Transfektion eingesetzten Zellzahlen auf die Transfektionseffizienz und die Viabilität der DC

Die von uns eingesetzten DC wurden aus *Buffy coats* gewonnen. Aus einem *Buffy coat* konnten maximal $1\text{-}2 \times 10^7$ DC isoliert werden. Daher wurde die Zahl der pro Transfektion einsetzbaren DC im Wesentlichen durch die Anzahl der insgesamt isolierten DC und die Versuchsplanung vorgegeben und konnte nur wenig variiert werden. Trotzdem ist es wünschenswert, den Einfluss der Zellzahl auf die Transfektionseffizienz und die Viabilität zu kennen. Verschiedene Zellzahlen wurden nach dem bisher erarbeiteten Protokoll mit pCMV-EGFP transfiziert und in der beschriebenen Weise die Transfektionseffizienz und Viabilität ermittelt.

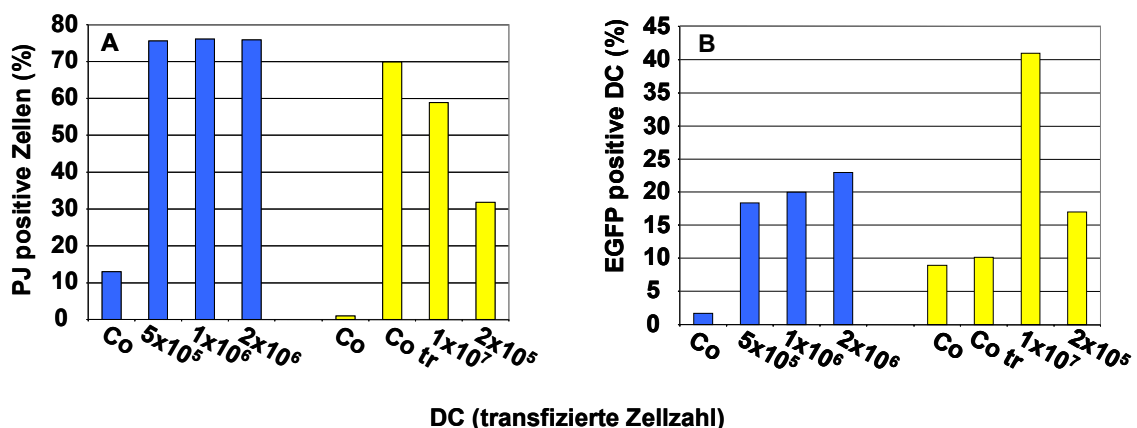


Abb. 3.2.4: Ermittlung der optimalen Zellzahl zu Transfektion von DC. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten zweier Donoren. Die fluorezenzzytometrische Messung erfolgte 24 h nach der Transfektion. A: Viabilität der Zellen. B: Transfektionseffizienz.

Die Transfektionseffizienz stieg mit zunehmender Zellzahl an. Die Viabilität der DC wurde von der zur Transfektion eingesetzten Zellzahl wenig beeinflusst. Es konnte aber beobachtet werden, dass die Viabilität der DC bei den verschiedenen Donoren extrem unterschiedlich ist. So wurden bei verschiedenen routinemäßig durchgeführten Viabilitätskontrollen bei Transfektion mit dem optimierten Protokoll bei den unterschiedlichen Donoren Sterberaten zwischen lediglich 10% bis 80% beobachtet.

3.2.2 Konstruktvalidierung

Der erfolgreiche Einsatz HPV16E7WT und –SH transfizierter DC als Stimulatoren kann nur Zustande kommen, wenn gewährleistet ist, dass das verwendete Konstrukt (pTHamp-HPV16E7WT, bzw. –SH) in den DC tatsächlich gebildet wird. Dieser Nachweis sollte auf RNA- und auf Proteinebene erbracht werden. Dendritische Zellen wurden unter den mit pCMV-EGFP entwickelten Bedingungen mit den zu untersuchenden Konstrukten transfiziert und 24h nach der Transfektion geerntet. Als Negativkontrolle wurden DC mit pCMV-EGFP transfiziert. Mit Hilfe der Trizolmethode wurde die RNA isoliert. Die Qualität der RNA wurde in einem 1% MOPS Agarosegel überprüft (s. Abb. 3.2.5). Die leichte Degradation der RNA, die in der Abbildung zu sehen ist, war tolerierbar.

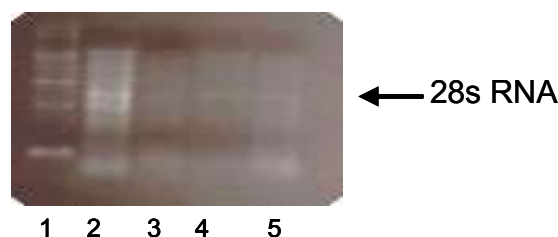


Abb. 3.2.5: Qualitätskontrolle der aus DC isolierten RNA. RNA wurde aus mit pTHamp-HPVE7SH und -WT transfizierten DC isoliert. Vor dem Einsatz im Northern Blot wurde die Qualität der RNA im MOPSagarosegel beurteilt. Spur 1: RNA Leiter (3 µg), Spur 2: CaSki RNA (3 µg), Spur 3: DC RNA pTHE7SH (2 µg), Spur 4: DC RNA pCMV-EGFP transfizierte DC (3 µg), Spur 5: DC RNA pTHE7WT (2 µg).

3.2.2.1 Nachweis von HPV16E7WT und –SH-Transskripten mittels Northern Blot

Die mittels Trizolisolation gewonnene RNA wurde direkt im Northern Blot eingesetzt. Als Sonde zur Hybridisierung wurde das E7WT-Fragment aus dem pTHamp Vektor herausgeschnitten und ³²P- markiert. Parallel wurde ein identischer Filter mit β-Actin hybridisiert, um auszuschließen, dass eventuell vorhandene Unterschiede in der Signalstärke auf unterschiedliche RNA-Mengen auf dem Filter zurückzuführen sind. In den Spuren, die RNA von E7WT und -SH transfizierten DC enthalten, wurden im Northern Blot Signale gefunden (Abb. 3.2.6). Das Signal für E7SH erscheint auf dem Film erwartungsgemäß etwas höher, als das WT-Signal. Dieser Größenunterschied entsteht durch die auf Grund des Appendix längere Sequenz des SH-Gens. Die RNA von pCMV-EGFP transfizierten DC erzeugt keine Signale im Northern Blot. Mit der verwendeten Sonde aus dem pTHamp-HPV16E7WT Vektor konnte das E7 aus CaSki RNA ebenfalls nicht detektiert werden. Ursache dafür ist die Codonoptimierung im E7WT-Gen, dessen DNA als Sonde eingesetzt wurde, die auch zu einer veränderten Sequenz in der mRNA führt.

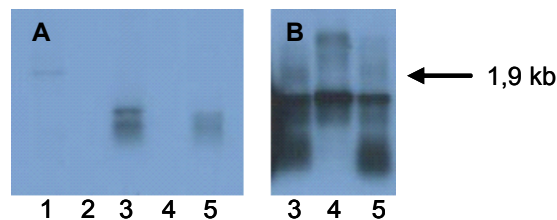


Abb. 3.2.6: Northern Blot der RNA von transfizierten DC. In Abb. A wurde als Sonde das E7WT-Fragment eingesetzt. Abb. B zeigt eine β -Actin Hybridisierung der Spuren 3-5. Spur 1: RNA Leiter (3 μ g), Spur 2: CaSki RNA (3 μ g), Spur 3: DC RNA pTHE7SH (2 μ g), Spur 4: DC RNA pCMV-EGFP transfiziert (2 μ g), Spur 5: DC RNA pTHE7WT (2 μ g).

3.2.2.2 Nachweis der HPV16E7WT und-SH Expression mittels RT-PCR

Zur Sicherstellung der Spezifität der im Northern Blot erhaltenen Signale für E7WT und –SH wurde die aus den DC isolierte RNA revers transkribiert. Die cDNA wurde in einer für E7WT bzw. E7SH spezifischen PCR als Template eingesetzt. Als Kontrolle wurde cDNA von pCMV-EGFP transfizierten DC mit den jeweiligen spezifischen Primern eingesetzt. Die im Agarosegel gefundenen Signale (Abb. 3.2.7) wiesen die erwarteten Größen von 295 bp für das E7WT, bzw. 457 bp für das E7SH auf. In den Spuren der Negativkontrollen fanden sich keine Banden. Es konnte folglich davon ausgegangen werden, dass sowohl im Northern Blot als auch in der RT-PCR die RNA von E7WT und –SH nachgewiesen werden konnte.

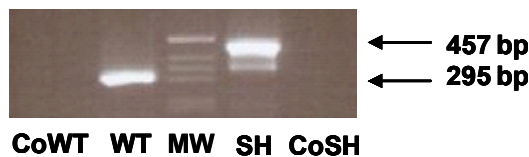


Abb. 3.2.7: Nachweis von HPV16E7Wt und –SH Expression in transfizierten DC durch PCR. Die aus transfizierten DC isolierte RNA wurde revers transkribiert. Die gewonnene cDNA wurde in einer spezifischen PCR als Matritze eingesetzt. Als Kontrolle wurde cDNA von pCMV-EGFP transfizierten DC mit den spezifischen Primern für HPV16E7WT (CoWT) und –SH (CoSH) eingesetzt.

3.2.2.3 Nachweis von HPV16E7WT und –SH Protein in den Lysaten von transfizierten DC

Für den Western Blot wurden die transfizierten DC in dem für die PAGE verwendeten Probenpuffer aufgekocht und die Zellen somit lysiert. Als Positivkontrolle wurde ein Proteinlysate der HPV16-positiven Zelllinie CaSk verwendet. Die Detektion der spezifischen Banden gelang mit einem für HPV16E7 spezifischen Antiserum (Abb. 3.2.8).



Abb. 3.2.8: Western Blot mit Lysaten von transfizierten DC. Pro Spur wurden 20 μ g Protein aus Gesamtzelllysat eingesetzt. Für den spezifischen Nachweis von HPV16E7SH und -WT wurde ein HPV16E7 spezifisches Antiserum aus der Ziege eingesetzt.

3.2.3 DC, die mit der Amaxa-Technologie transfiziert werden, zeigen keine Hochregulation von Differenzierungsmarkern

Zur effizienten Antigenpräsentation durch dendritische Zellen ist es notwendig, dass diese Oberflächenstrukturen exprimieren, die als costimulatorische Signale bei der T-Zellaktivierung wirksam sind. In *in vitro* Kulturen muss dieser Stimulus zur terminalen Differenzierung der DC durch Zugabe eines Differenzierungsreagenz zugegeben werden. In unserem Labor wurde nach diversen Optimierungsexperimenten (Dissertation Marion Nonn) der Zytokincocktail (CC) nach Jonuleit (1997) zur Ausreifung von DC nach Antigenbeladung erfolgreich eingesetzt. Die Hochregulation der costimulatorischen Signale nach Zugabe des Differenzierungsreagenz kann als Differenzierungsmarker eingesetzt werden. Im Verlauf der Optimierung der DC Transfektion mit der Amaxa-Technologie wurden als Differenzierungsmarker CD83, CD86 und MHCII routinemäßig verwendet. Besonders CD83 gilt als wichtiger selektiver Marker für reife DC, die aus Blutmonozyten gewonnen wurden (Zhou et al., 1992, Zhou und Tedder, 1995). Es wurde beobachtet, dass mit der Amaxa-Methode transfizierte DC diese Differenzierungsmarker nach Zugabe von CC nicht hochregulieren. Das in Abb. 3.2.9 gezeigte Experiment sollte Aufschluss darüber geben, ob dieser Effekt eventuell durch die transfizierte DNA selbst ausgelöst wird und ob er nach Zugabe anderer Differenzierungsreagenzien, wie LPS (Sallusto et al., 1995) oder α -CD40 Antikörper ebenfalls auftritt. Tabelle 3.2.1 zeigt die Mean-Werte der MHCII-Färbung. Da MHCII auch auf der Oberfläche von unreifen DC exprimiert wird, kann die Hochregulierung so am besten beurteilt werden. Unbehandelte DC reagierten auf die Zugabe der Differenzierungsreagenzien mit deutlicher Hochregulierung der untersuchten Marker. Dabei zeigte der Zytokincocktail die beste Wirkung auf die Differenzierung der DC. Nach Durchlaufen der Transfektionsprozedur waren die DC nicht mehr in der Lage, die untersuchten Differenzierungsmarker hochzuregulieren, auch wenn dem Transfektionsansatz keine DNA zugesetzt wurde. Das bedeutete, dass der Einsatz von mit der Amaxa-Technologie transfizierten DC als effektive Stimulatoren von T-Zellen nach diesem Protokoll nicht möglich sein würde.

Tab. 3.2.1: MFI (*mean fluorescence intensity*) der MHCII-Färbung von transfizierten DC nach 24 h Ausreifung

	unreif ¹	CC ²	LPS ³	α –CD40L
unbehandelt	622	1173	1078	1142
transfiziert ohne DNA	247	626	252	415
transfiziert mit DNA	291	242	160	468

¹ DC ohne Zusatz von Reifungsreagenz

² DC mit Zusatz von Zytokincocktail

³ DC mit Zugabe von LPS

⁴ DC mit Zugabe von α -CD40

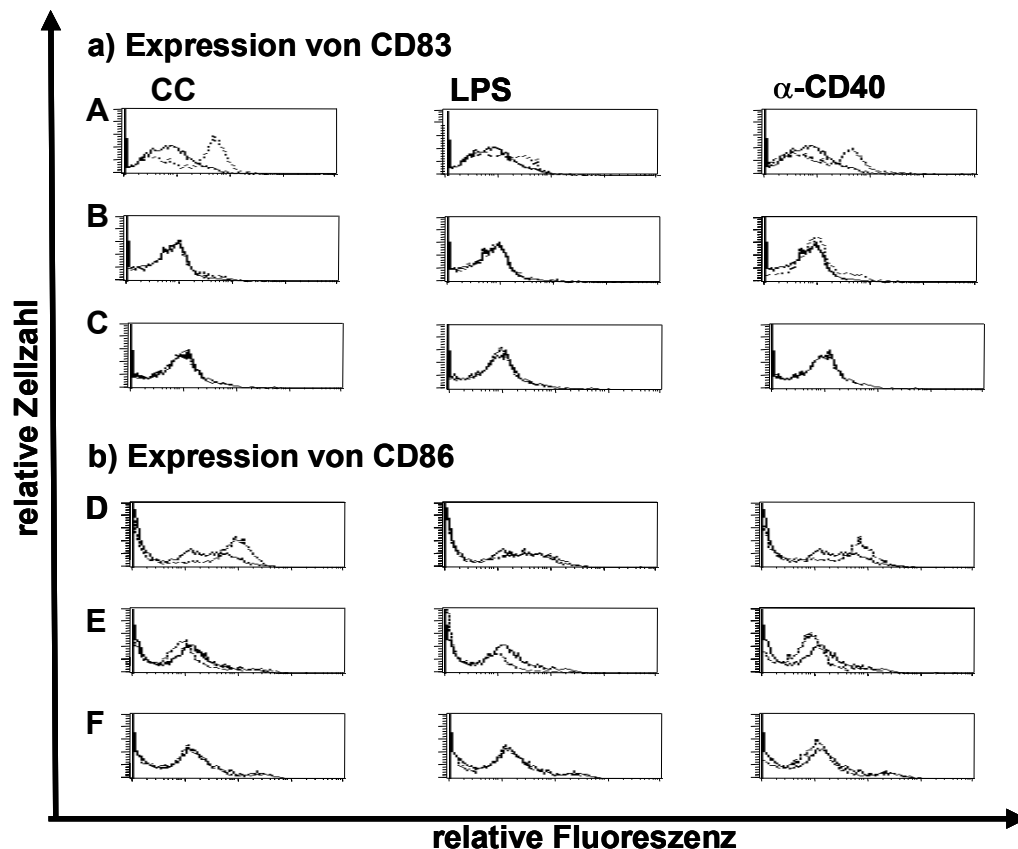


Abb. 3.2.9. Expression von Reifungsmarkern nach der Transfektion. DC wurden gemäß dem optimierten Amaxa Transfektionsprogramm transfiziert. Vier Stunden nach der Transfektion wurden die verschiedenen Ausreifungsreagenzien zugesetzt. Untransfizierte DC dienten als Vergleich. Die Anfärbung der Reifungsmarker erfolgte 24 h nach der Transfektion: Histogramm Plots zur Darstellung der Expression von CD83 (a) und CD86 (b), A und D: nicht transfizierte DC, B und E: ohne Zusatz von DNA transfiziert, C und F: mit 5 μ g pTHamp-HPV16E7WT transfizierte DC.

3.2.3.1 Nachweis der EGFP-Expression in transfizierten DC

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit galt die Lehrmeinung, dass nur unreife DC die Fähigkeit zur Aufnahme von Antigenen besitzen, während differenzierte DC diese Fähigkeit verlieren, aber durch die hohe Expression der kostimulatorischen Signale dann die Fähigkeit der Antigenpräsentation aufweisen. Damit war vorgegeben, dass dendritische Zellen in unreifem Zustand transfiziert werden sollten, um anschließend ausdifferenziert zu werden. Aufgrund der ausbleibenden Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle nach der

Amaya-Transfektion wurde getestet, ob auch ausgereift transfigierte DC transfigierbar sind. Zu diesem Zweck wurden DC nach dem bisher verwendeten Protokoll in unreifem Zustand und nach vorheriger Inkubation mit CC mit 5 µg pCMV-EGFP transfigiert. Den unreifen DC wurde 4 h nach der Transfektion CC zugesetzt. 24 h nach der Transfektion wurden die DC mit PJ angefärbt und die EGFP-Expression, sowie die Überlebensrate der DC am FACS bestimmt.

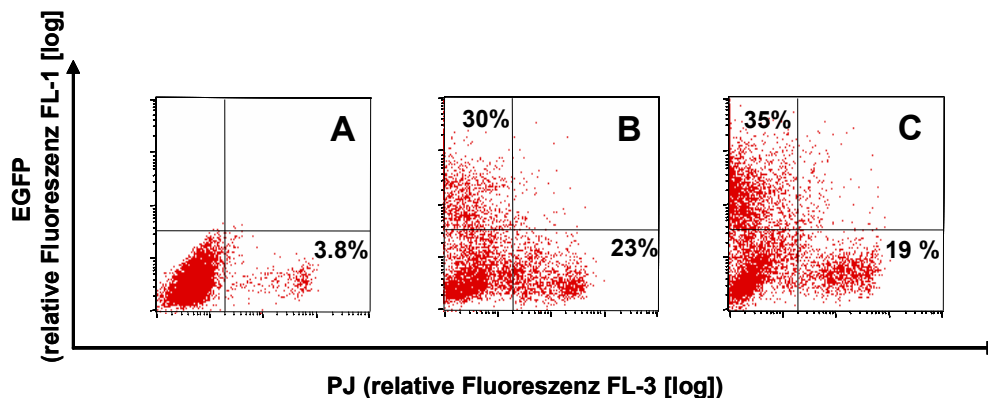


Abb. 3.2.10: Transfektionseffizienz von unreif und ausgereift transfigierten DC. DC desselben Donors wurden in unreifem Zustand und nach Inkubation mit Zytokincocktail mit 5 µg pCMVEGFP transfigiert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit PJ gefärbt und die Transfektionseffizienz, sowie die Überlebensrate der Zellen durch FACS-Analyse ermittelt. Die Zahl der Transfigierten und der toten Zellen wurden in % in der Grafik angegeben. A: nicht transfigierte DC, B: ausgereift transfigierte DC, C: unreif transfigierte DC.

Zwischen reif und unreif transfigierten DC zeigen sich keine ausgeprägten Unterschiede. Reife DC sind mit vergleichbarer Effizienz transfigierbar und zeigen eine ähnliche Überlebensrate, wie unreif transfigierte DC. Dieses Experiment konnte dreimal mit vergleichbarem Ergebnis reproduziert werden.

3.2.3.2 Phänotypisierung von transfigierten DC

Als nächstes stellte sich die Frage, ob sich durch die Transfektion reifer DC ihr Phänotyp verändert. DC wurden wie im vorherigen Abschnitt beschrieben mit 5 µg pTHamp-HPV16E7WT transfigiert. 24 h nach der Transfektion wurden die Differenzierungsmarker mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt und die DC im Durchflusszytometer vermessen (Abb. 3.2.11).

Bei unreifen DC war die Zahl der an der Oberfläche befindlichen MHCII Moleküle niedrig, denn die MFI der MHCII Färbung betrug 845. Wurden die DC für 24 h mit Zytokincocktail kultiviert, wurde die Expression der betrachteten Differenzierungsmarker hochreguliert. Die Anzahl der MHCII Moleküle stieg stark an.

Die Zahl der Zellen, die CD83 auf der Zelloberfläche exprimierten, stieg von 1% auf 72%.

Für CD86 wurde ein Anstieg von 51% auf 77% gemessen. Unreif transfizierte Zellen, die für 24 h mit Zytokincocktail kultiviert wurden, zeigten nur eine geringfügig höhere Expression dieser Moleküle als unreife DC. In diesem Experiment wurden bei unreif transfizierten DC 20% CD83 und 63% CD86 exprimierende Zellen gefunden. Wurden die DC zuerst für 24 h ausgereift und anschließend transfiziert, so fand man nach weiteren 24 h einen Phänotyp, der mit 63% CD83 und 93% CD86 exprimierenden Zellen nur unwesentlich von dem Phänotyp der untransfizierten reifen DC abwich. Damit konnte gezeigt werden, dass ausgereift transfizierte DC ihren reifen Phänotyp auch nach der Transfektion erhalten. Die Ergebnisse konnten anhand der DC von drei weiteren Donoren reproduziert werden.

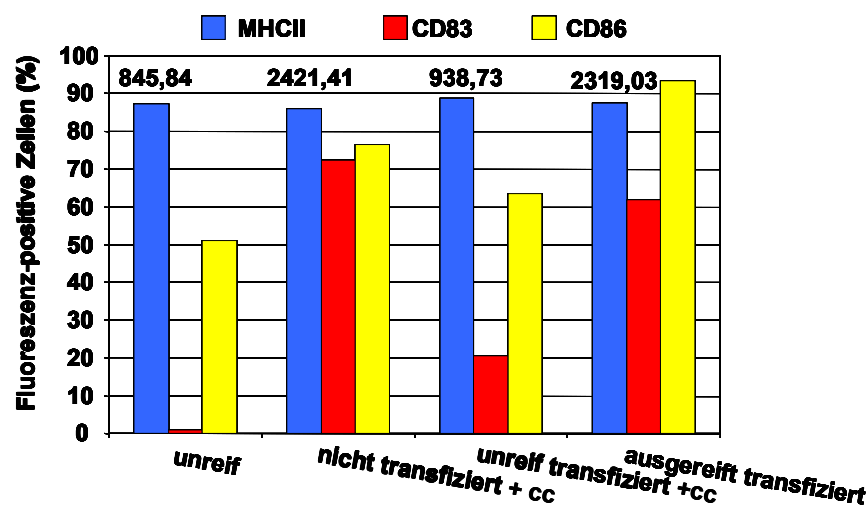


Abb. 3.2.11: Phänotypisierung von dendritischen Zellen. Unreife und ausgereifte DC wurden mit pTHamp-HPVE7WT transfiziert. Nach 24 h wurde die Expression der Differenzierungsmarker MHCII, CD83 und CD86 bestimmt. Zum Vergleich wurde die Expression von Differenzierungsmarkern bei unreifen und ausgereiften, aber nicht transfizierten DC gemessen.

3.2.3.3 Messung der IL-12 Produktion von unreif und ausgereift transfizierten DC

Die IL-12 Sekretion durch DC ist ein wichtiger Hinweis auf ihre Fähigkeit, T_{H1} -Zellen und CTL zu induzieren. In Kulturüberständen von DC wurde die Menge an sezerniertem IL-12 mittels ELISA vermessen. Zur Gewinnung der Kulturüberstände wurden DC ausgereift und unreif transfiziert. Nicht transfiziert ausgereifte bzw. unreife DC wurden als Kontrolle mitgeführt, ebenso DC, die lediglich mit DNA zusammen kultiviert wurden. Diese Kontrolle wurde mitgeführt, um auszuschließen, dass die Zugabe der DNA selbst ein Stimulus zur Hochregulation der IL-12 Sekretion darstellt. Die Überstände wurden nach 48h geerntet und die IL-12 Konzentrationen bestimmt. Jede Messung wurde in Duplikaten durchgeführt. In Abb. 3.2.12 wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Messung von vier

Donoren dargestellt.

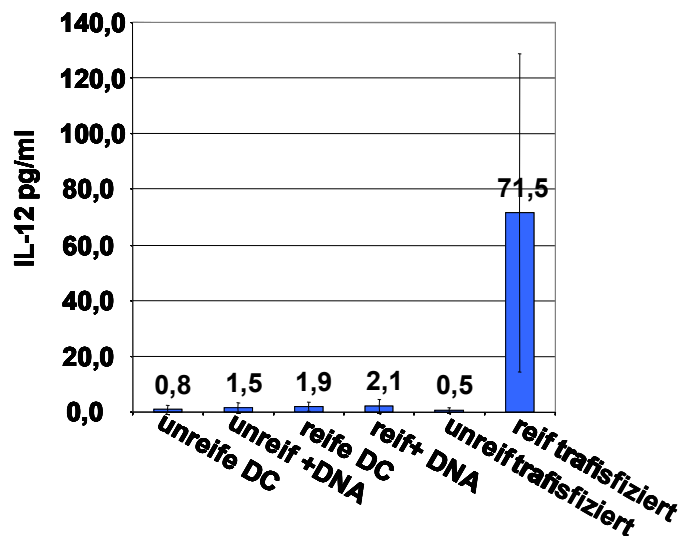


Abb. 3.2.12: IL-12 Expression in transfizierten DC. Die Konzentration des IL-12 im Kulturüberstand wurde mittels IL-12 ELISA bestimmt. Nach der Transfektion wurden die DC in einer Dichte von 1×10^6 /ml ausgesät. Bei unreif transfizierten DC wurde der Zytokincocktail 4h nach der Transfektion zugesetzt. Die Überstände wurden 48 h nach der Transfektion geerntet. Dargestellt wurden die Mittelwerte von 4 Donoren und die Standardabweichungen .

Die IL-12 Konzentrationen, die in den Kontrollen gefunden wurden, entsprechen in etwa den Erwartungen (Spisek *et al.*, 2001). Erstaunlicherweise wurden in den Kulturüberständen ausgereift transfizierter DC etwa 50mal mehr IL-12 gefunden, als in der Kontrollgruppe der reifen DC.

3.2.3.4 Vergleich von unreif und ausgereift transfizierten DC in der Allo-MLR

Die Fähigkeit von DC, T-Zellen zu aktivieren, kann in einer *Mixed Lymphocyte Reaction* (MLR) dargestellt werden. Dabei werden die unterschiedlich behandelten DC jeweils zu ihren autologen und zu allogenen naiven peripheren Blutlymphozyten (PBL) gegeben. Werden die T-Zellen durch die DC zur Proliferation stimuliert, wird das durch erhöhten Einbau von ^3H -Thymidin messbar.

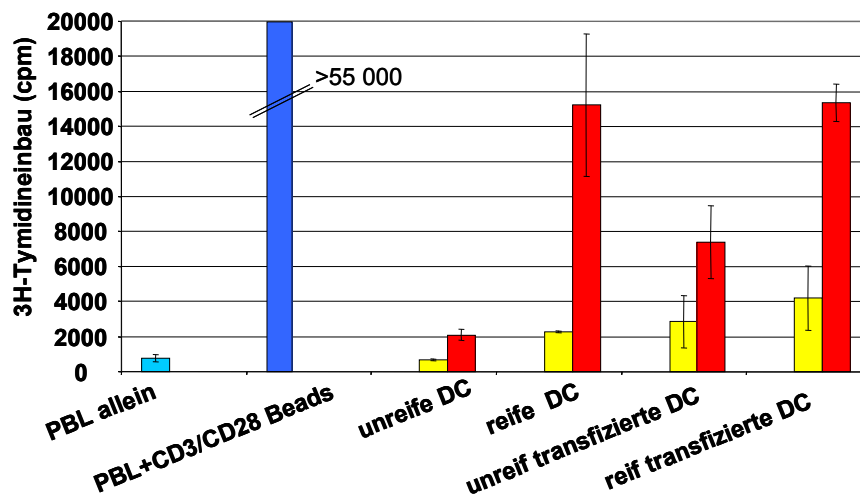


Abb. 3.2.13: Funktioneller Test von DC in einer Allo-MLR. Die PBL wurden mit autologen (gelb) und allogenen DC stimuliert (rot). Die Stimulationsfähigkeit der DC wurde über den 3H-Thymidineinbau in die proliferierenden PBL ermittelt. Jeder Balken zeigt den Mittelwert \pm Standardabweichung von Triplikaten. Die Grafik zeigt die Allo-MLR eines ausgewählten Donors. Dieses Ergebnis wurde mit den Zellen drei weiterer Donoren bestätigt.

Tabelle 3.2.2: Signifikanztest zu den der Allo-MLR

Vergleichspartner	P%
unreife DC autolog/allogen	0,12
reife DC autolog /allogen	0,0001
unreif transfiziert autolog/allogen	0,014
reif transfiziert autolog/allogen	0,0015
unreif transfiziert allogen/ reif transfiziert allogen	0,03
PBL allein/ unreife DC	0,5

Wie Abb. 3.2.13 zeigt, zeigen sowohl unreif als auch ausgereift transfizierte DC eine signifikant spezifische Reaktion in der Allo-MLR. Allerdings sind unreife DC sehr schlechte Stimulatoren in der Allo-MLR (1593 cpm \pm 1619, P%=0,014), wohingegen reife DC sehr gute Stimulatoren waren (15215 cpm \pm 4067, P%=0,0015). Werden die DC in reifem Zustand transfiziert, ist ihre Fähigkeit zur Stimulation von allogenen naiven T-Zellen mit denen von untransfizierten reifen DC vergleichbar (15359 \pm 359). Die unreif transfizierten DC sind, wie der Students t-Test ergab, signifikant schlechtere Stimulatoren in der Allo-MLR p%=0,03).

3.2.4 Restimulation von HPV16E7WT-spezifischen T-Zelllinien mit pTHamp-HPV16E7SH transfizierten DC

In Kapitel 3.2.3.4 wurde gezeigt, dass mit der Amaxa-Technologie in unreifem Zustand transfizierte DC nicht mehr in der Lage waren terminal zu differenzieren. In einer Reihe von Versuchen wurde gezeigt, dass ausgereift transfizierte DC ein transfiziertes Gen exprimieren können (EGFP) und der reife Phänotyp nach der Transfektion erhalten bleibt. Sie sekretieren große Mengen IL-12 und sind gute Stimulatoren in der Allo-MLR.

In diesem Kapitel soll untersucht werden, ob ausgereift transfizierte DC tatsächlich, wie die Daten in Kapitel 3.2.3. vermuten ließen, antigenspezifische Linien besser restimulieren können als unreif transfizierte DC. Durch den Einsatz von pTHamp-HPV16E7SH kann dabei zusätzlich geklärt werden, ob E7SH in der Lage ist, E7-Wildtyp-spezifische T-Zelllinien zu restimulieren. Zu diesem Zweck wurden aus den *Buffy Coats* von vier gesunden Donoren (B580, B609, B612 und B615) T-Zellen und DC isoliert. Die naiven T-Zellen wurden dreimal in wöchentlichen Abständen mit DC stimuliert, die mit einem Pool aus fünf überlappenden HPV16E7 35mer Peptiden gepulst worden waren. Nach der dritten Stimulation ruhten die T-Zelllinien für drei Wochen, bevor sie im INF- γ ELISpot und im Proliferationsassay getestet wurden.

3.2.4.1 Reaktion von E7WT-spezifischen Linien im INF- γ ELISpot nach Restimulation mit unreif und ausgereift transfizierten DC

Um einen Vergleich zwischen dem Restimulationspotential von unreif transfizierten DC und ausgereift transfizierten DC ziehen zu können, wurden beide Varianten zur Restimulation der E7-wildtypspezifischen T-Zelllinien eingesetzt. Als Kontrollansätze wurden pCMV-EGFP transfizierte DC als Stimulatoren der T-Zellen eingesetzt, die auch entweder unreif oder ausgereift transfiziert worden waren. Als Positivkontrolle wurde die INF- γ Sekretion der T-Zelllinien nach Restimulation mit dem 35mer Peptidpool genommen.

In einigen Wells war die Spotzahl so groß, dass eine genaue Auszählung der Spots mit dem ELISpot-Lesegerät nicht mehr möglich war. Da die maximal lesbare Spotzahl bei 600 Spots lag, wurden alle Wells, die auf Grund noch höherer Spotzahl nicht auswertbar waren, als >600 Spots/Well bewertet. Als spezifische Reaktion wurde ein Ansatz bewertet, wenn die Standardabweichung sich nicht mit der der dazugehörigen Kontrolle überschneidet, bzw. das Ergebnis des Students t-Test beim Vergleich der Spotzahl/Well zwischen Kontrollreaktion und spezifischem Ansatz $<0,05$ lag. In Tabelle 3.2.3 sind die Ergebnisse des ELISpots zusammengefasst. Die T-Zelllinien aller vier Donoren reagierten im ELISpot mit spezifischer INF- γ Sekretion auf die pepdidgepulsten DC. Eine genaue Spotzahl kann für die Reaktionen nicht angegeben werden, da in allen vier Fällen die Spotzahl der

spezifischen Reaktion zu hoch war, um ausgelesen zu werden.

Tab. 3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse des INF- γ ELISpots

	peptidgepulste DC als Stimulatoren				unreif transfizierte DC als Stimulatoren				reif transfizierte DC als Stimulatoren			
Donor	Co ₁	spezif ₂	p % ₃	% ₄	Co ₁	spezif ₂	p % ₃	% ₄	Co ₁	spezif ₂	p % ₃	% ₄
B580	301 ± 9	>600 ⁵	5x10 ⁻⁴	>0,12	326 ± 3	321 ± 25	-	-	198 ± 155	353 ± 30	0,1	-
B609	402 ± 27	>600 ⁵	4x10 ⁻⁶	>0,12	290 ± 4	291 ± 14	0,9	-	275 ± 2	427 ± 6	4x10 ⁻⁵	0,3
B612	319 ± 14	>600 ⁵	0,003	>0,12	346 ± 15	284 ± 18	-	-	386 ± 9	445 ± 0,7	0,006	0,1
B615	247 ± 40	>600 ⁵	0,006	>0,12	216 ± 25	230 ± 4	0,5	-	91 ± 4	>600 ⁵	9x10 ⁻⁴	>0,12

¹ Anzahl der Spots in der Negativkontrolle, T-Zellen restimuliert mit Humanalbumin beladenen DC bzw. unausgereift oder ausgereift pCMV-EGFP transfizierten DC, die Standardabweichung aus den Duplikaten wurde hinzugefügt

² Anzahl der Spots in der Reaktion gegen das spezifische Antigen, + Standardabweichung der Duplikate

³ Ergebnis des Students t-test

⁴ Frequenz der INF- γ sezernierenden T-Zellen in %

⁵ Die Spotzahl lag oberhalb Auflösungsgrenze ELISpot-Lesegeräts. Die Spotzahl wurde als >600 angegeben, da dies in diesem Assay die maximal gelesene Spotzahl war. Die statistische Auswertung basiert auf dieser geschätzten Spotzahl.

Wurden unreif transfizierte und anschließend mit CC inkubierte DC als Stimulatoren eingesetzt, konnte in keiner der untersuchten Linien spezifische INF- γ Sekretion gefunden werden. In zwei Fällen (B580 und B612) lag die Spotzahl der Kontrolle über der im spezifischen Ansatz. Hier wurde keine statistische Auswertung mit dem Students t-Test vorgenommen. Bei den Donoren B609 und B615 lag der errechnete P-Wert bei 0,9, bzw. 0,5. Es wurden also keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und spezifischer Reaktion gefunden. Wurden ausgereift transfizierte DC zur Restimulation der E7-spezifischen Linien verwendet, ließ sich in drei der vier untersuchten T-Zelllinien eine spezifische Stimulation durch pTHamp-HPV16E7SH feststellen. Sofern die exakten Spotzahlen ermittelt werden konnten, fanden sich Frequenzen an spezifischen CTL zwischen 0,1 und 0,3.

Tab. 3.2.4: Zusammenfassung der Ergebnisse des CFSE-Proliferationsassays

Donor	restimuliert mit		Co ¹	spezif ²	p% ³
B580	Peptid	CD4 ⁺	66±11	27±4	0,04
		CD8 ⁺	41±9	26±4	0,17
	unreif transfiziert	CD4 ⁺	104±4	99±4	0,3
		CD8 ⁺	93±1	116±1	-
	ausgereift transfiziert	CD4 ⁺	106±2	77±1	0,0036
		CD8 ⁺	92±1	77±3	0,02
B609	Peptid	CD4 ⁺	53±1	46±1	0,011
		CD8 ⁺	55±1	39±2	0,015
	unreif transfiziert	CD4 ⁺	51±2	50±3	0,62
		CD8 ⁺	45±1	39±5	0,23
	ausgereift transfiziert	CD4 ⁺	55±1	39±2	0,008
		CD8 ⁺	49±1	31±1	0,002
B612	Peptid	CD4 ⁺	83±8	45±5	0,02
		CD8 ⁺	91±3	81±7	0,2
	unreif transfiziert	CD4 ⁺	101±2	100±2	0,8
		CD8 ⁺	105±1	111±4	0,18
	ausgereift transfiziert	CD4 ⁺	92±1	86±2	0,04
		CD8 ⁺	107±4	92±2	0,04
B615	Peptid	CD4 ⁺	64±5	37±1	0,014
		CD8 ⁺	78±2	54±1	0,04
	unreif transfiziert	CD4 ⁺	72±1	70±1	0,06
		CD8 ⁺	80±1	71±1	0,007
	ausgereift transfiziert	CD4 ⁺	73±1	60±1	0,002
		CD8 ⁺	90±1	78±1	0,007

¹mittlere Fluoreszenz (mean all) der Kontrollreaktion der T-Zellen gegen mit Humanalbumin beladene DC ± Standardabweichung aus Triplikaten

²mittlere Fluoreszenz (mean all) der spezifischen Reaktion der T-Zellen gegen den HPV16E7 35mer Peptidpool ± Standardabweichung aus Triplikaten

³Ergebnis des Students t-Test, Vergleich spezifische Reaktion gegen Kontrollreaktion

Wurden unreif transfizierte und anschließend mit CC inkubierte DC als Stimulatoren eingesetzt, konnte in keiner der untersuchten Linien spezifische INF- γ Sekretion gefunden werden. In zwei Fällen (B580 und B612) lag die Spotzahl der Kontrolle über der im spezifischen Ansatz. Hier wurde keine statistische Auswertung mit dem Students t-Test vorgenommen. Bei den Donoren B609 und B615 lag der errechnete P-Wert bei 0,9, bzw. 0,5. Es wurden also keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und spezifischer Reaktion gefunden. Wurden ausgereift transfizierte DC zur Restimulation der E7-spezifischen Linien verwendet, ließ sich in drei der vier untersuchten T-Zelllinien eine spezifische Stimulation durch pTHamp-HPV16E7SH feststellen. Sofern die exakten Spotzahlen ermittelt werden konnten, fanden sich Frequenzen an spezifischen CTL zwischen 0,1 und 0,3.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse des CFSE-Proliferationsassays sollte, auch in den noch folgenden Experimenten, darauf geachtet werden, dass ein niedriger Zahlenwert für die mittlere Fluoreszenz bedeutet, dass eine starke Proliferation der Zellen stattgefunden hat, da die CFSE-Markierung mit zunehmenden Zellteilungen abnimmt. Auch im CFSE-Proliferationsassay (Tab. 3.2.4) konnte keine Restimulierung der spezifischen T-Zelllinien durch unreif mit pTHamp-HPV16E7SH beladene DC ausgelöst werden, wohingegen die reif transfizierten sowohl eine spezifische Reaktion der CD8⁺ als auch der CD4⁺ T-Zellen zeigen.

Mit Hilfe dieser Restimulationsexperimente konnte klar gezeigt werden, dass dendritische Zellen, die in reifem Zustand transfiziert wurden, geeignet sind, T-Zellen spezifisch zu restimulieren. 3/4 der E7-spezifische Linien zeigten spezifische INF- γ Sekretion und 4/4 Linien zeigten spezifische Proliferation, sowohl der CD4⁺, als auch der CD8⁺ T-Zellen (Tab. 3.2.3 und 3.2.4), nach Restimulation mit ausgereiften DC. Unausgereifte DC konnten nur bei Donor B615 eine spezifische Proliferation der CD8⁺ T-Zellen auslösen (Tab. 3.2.4). Sie sind schlechtere Stimulatoren, wie auch schon auf Grund der Ergebnisse der Experimente aus Kapitel 3.2.3 vermutet wurde. Diese Ergebnisse waren ein wichtiger Schritt bei der Validierung der entwickelten Transfektionsmethode. Sie zeigen, dass die Verwendung von ausgereift transfizierten DC als Stimulatoren möglich ist.

3.2.5 Aktivierung von naiven T-Zellen mit DNA transfizierten DC

Im vorigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass es DC, die in ausgereiftem Zustand mit der Amaxa Technologie mit pTHamp-HPV16E7SH und –WT transfiziert wurden, von wildtypspezifischen T-Zellen erkannt werden und diese restimulieren können. DC, die unreif transfiziert wurden, waren kaum in der Lage, spezifische T-Zellen zu restimulieren. In diesem Abschnitt soll die Frage beantwortet werden, ob in dieser Weise beladene dendritische Zellen auch in der Lage sind, naive T-Zellen zu aktivieren und eine

Immunantwort zu induzieren, die gegen das Wildtypantigen gerichtet ist. In Vorversuchen war es nicht gelungen, E7-spezifische T-Zelllinien mit DC zu generieren, denen erst nach der Amaxa-Transfektion Ausreifungsreagenz zugesetzt worden war.

3.2.5.1 Generierung der HPV16E7 35mer Peptid- und pTHamp-HPV16E7-induzierten T-Zelllinien

Aus den *Buffy Coats* von vier gesunden HLA-A2 positiven Donoren (B614, B630, B635 und B637) wurden T-Zellen und DC isoliert. Die T-Zellen wurden dreimal in wöchentlichen Abständen mit den autologen DC stimuliert. Pro Donor wurden zwei Linien angelegt. Eine T-Zelllinie wurde mit HPV16E7 35mer gepulsten DC als Stimulatoren generiert und eine T-Zelllinie wurde mit DC stimuliert, die in reifem Zustand mit pTHampHPV16E7SH transfiziert worden waren. Nach der dritten Restimulation ruhten die T-Zelllinien weitere drei Wochen, bevor sie in den immunologischen Assays untersucht wurden.

3.2.5.2 Phänotypisierung der Peptid- und DNA-induzierten T-Zelllinien

Nach Ende der Ruhephase wurden die generierten Linien phänotypisiert, d.h. es wurde durch direkte Fluoreszenzanzfärbung der interessanten Oberflächenmoleküle der Anteil CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sowie der natürlichen Killerzellen (NK, CD56) in den Linien bestimmt (Tab. 3.2.5). Es fiel auf, dass in DNA-induzierten Linien der Anteil an CD8⁺ T-Zellen bedeutend höher war, als in den Linien, bei denen Peptide zur Induktion eingesetzt wurden. In peptidinduzierten Linien wurden zwischen 13% und 54% CD8⁺ T-Zellen gefunden. Der CD8⁺ Anteil in DNA-induzierten Linien lag bei diesen Donoren zwischen 63% und 76%. Im Blut findet man für gewöhnlich, dass die CD8⁺ einen Anteil von 20-30% an der gesamten T-Zellpopulation ausmachen.

Tab. 3.2.5: Phänotypisierung der T-Zelllinien der Donoren B614, B630, B635 und B6373

T-Zelllinie	% positiver Zellen		
	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD56 ⁺
B614 pp ¹	64,3	38,86	11,36
B614 DNA ²	20,38	70,3	8,38
B630 pp ¹	60,87	45,43	5,7
B630 DNA ²	34,74	63,33	14,06
B635 pp ¹	51,55	53,99	4,91
B635 DNA ²	31,35	76,49	5,69
B637 pp ¹	60,43	42,86	9,85
B637 DNA ²	21,71	70,46	16,81

¹ Mit HPV16E7 35mer Peptiden induzierte Linien wurden mit pp bezeichnet

² mit pTHamp-HPV16E7SH induzierte Linien wurden mit DNA bezeichnet

³ Phänotypisierung wurde drei Wochen nach der letzten Restimulation durchgeführt und damit zum selben Zeitpunkt wie auch CFSE-Proliferationsassay und INF- γ ELISpot

3.2.5.3 Spezifische Proliferation der HPV16E7 35mer Peptid- und pTHamp- HPV16E7 induzierten T-Zelllinien

Die T-Zelllinien wurden im CFSE-Proliferationsassay auf ihre Fähigkeit untersucht, nach Restimulation mit Peptiden zu proliferieren. Mit 35mer Peptiden beladene DC wurden als APC eingesetzt. Als Kontrollreaktion wurden DC mit Humanalbumin gepulst. Die Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurde getrennt ausgewertet. Als spezifisch wurde eine Reaktion gewertet, wenn die Standardabweichungen der Kontrollreaktion und der Reaktion gegen die 35mer Peptide sich nicht überschneiden, bzw. das Ergebnis des Students t-Test ein Ergebnis von $P\% < 0,05$ ergab. Tabelle 3.2.6 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse des CFSE-Proliferationstests für alle acht Linien.

In diesem Assay zeigten 3/4 peptidinduzierten Linien eine spezifische Proliferation nach Restimulation mit den mit 35mer Peptiden beladenen DC. Es konnte sowohl eine spezifische Antwort der CD4⁺ als auch der CD8⁺ T-Zellen gefunden werden. Bei der mit Peptiden generierten T-Zelllinie des Donors B614 konnte weder eine spezifische Proliferation der CD4⁺ noch der CD8⁺ T-Zellen gefunden werden. Die Ergebnisse der pTHamp-HPV16E7SH induzierten Linien sind deshalb nicht klar zu interpretieren. 3/4 untersuchten T-Zelllinien zeigen spezifische Proliferation nach Restimulation mit HPV16E7 Peptiden. Bei den E7SH induzierten Linien der Donoren B614 und B637 wurde spezifische Proliferation der CD4⁺ T-Zellen ermittelt. In den Linien der Donoren B630 und B635 wurde spezifische Proliferation der CD8⁺ T-Zellen gefunden. Anhand der Standardabweichungen dieser Linien zeigt sich, dass zum Teil die große Streuung der ermittelten Mean-Werte die Auswertung dieses Versuchs erschwert. Tatsächlich weist das Ergebnis dieses Versuchs darauf hin, dass die pTHamp-HPV16E7SH transfizierten DC tatsächlich in der Lage waren, eine Aktivierung in den naiven T-Zellen zu induzieren. Diese Aussage sollte aber durch die Ergebnisse anderer funktioneller Assays unterstützt werden.

Tabelle 3.2.6: CFSE-Proliferationsassay der Peptid- und DNA-induzierten Linien:

	generiert mit		Co ¹	spezif. ²	p% ³
B614	35mer Peptiden	CD4 ⁺	155,8±4	155,8±6	0,9
	35mer Peptiden	CD8 ⁺	178±2	197,8±0,5	0,3
	pTHamp-HPV16E7SH	CD4 ⁺	166,6±4	154,8±5	0,03
	pTHamp-HPV16E7SH	CD8 ⁺	321,1±7	302,8±6	0,13
B630	35mer Peptiden	CD4 ⁺	330,9±0,2	211,8±11	5x10 ⁻⁵
	35mer Peptiden	CD8 ⁺	282,8±5	269±16	0,049
	pTHamp-HPV16E7SH	CD4 ⁺	630,4±29	593,9±12	0,1
	pTHamp-HPV16E7SH	CD8 ⁺	614,2±28	532,3±0,5	0,008
B635	35mer Peptiden	CD4 ⁺	430±13	383,2±18	0,02
	35mer Peptiden	CD8 ⁺	296,1±4	240,3±16	0,004
	pTHamp-HPV16E7SH	CD4 ⁺	212,7±7	208±11	0,5
	pTHampE7SH	CD8 ⁺	223,8±8	199,5±0,1	0,04
B637	35mer Peptiden	CD4 ⁺	498,4±5	413,6±13	0,001
	35mer Peptiden	CD8 ⁺	360,2±18	294,9±1	0,01
	pTHamp-HPV16E7SH	CD4 ⁺	439,8±6	415,9±15	0,04
	pTHampE7SH	CD8 ⁺	312,8±22	299,8±7	0,3

¹mittlere Fluoreszenz (mean all) der Kontrollreaktion der T-Zellen gegen mit Humanalbumin beladene DC ± Standardabweichung aus Triplikaten

²mittlere Fluoreszenz (mean all) der spezifischen Reaktion der T-Zellen gegen den HPV16E7 35mer Peptidpool ± Standardabweichung aus Triplikaten

³Ergebnis des Students t-Test, Vergleich spezifische Reaktion gegen Kontrollreaktion

3.2.5.4 Spezifische Interferon- γ Sekretion der HPV16E7 35mer Peptid- und HPV16E7pTHamp-induzierten T-Zelllinien

Die in den vorherigen Kapiteln besprochenen T-Zelllinien wurden im INF- γ ELISpot auf spezifische INF- γ Sekretion nach Restimulation mit E7-Wildtyp Peptiden untersucht. Hierzu wurden DC mit dem HPV16E7 35mer Peptidpool beladen und als Stimulatoren eingesetzt. Als Kontrollreaktion wurde die Reaktion gegen Humanalbumin verwendet.

Im ELISpot wurden sowohl die Peptid- als auch die DNA aktivierten T-Zelllinien positiv getestet. Ausschließlich die pTHamp-HPV16E7SH induzierte Linie des Donors B630 zeigt keine spezifische INF- γ Sekretion (vgl. Tab. 3.2.7). Diese Linie hatte aber spezifische

Proliferation der CD8⁺ im CFSE-Proliferationsassay gezeigt (vgl. Tab.3.2.6).

I

Tabelle 3.2.7: Zusammenfassung der Ergebnisse des INF- γ ELISpots der HPV16E7 35mer Peptidpool und HPV16E7SH induzierten T-Zelllinien

Donor	aktiviert mit	Spots Co ¹	Spots spezif. ²	p% ³	Frequenz % ⁴
B614	35mer Peptiden	21 \pm 1,5	126 \pm 23	0,02	0,21
	pTHamp-HPV16E7SH	46 \pm 9	200 \pm 17	0,002	0,31
B630	35mer Peptiden	75 \pm 14	127 \pm 7	0,008	0,10
	pTHamp-HPV16E7SH	44 \pm 7	29 \pm 7	-	-
B635	35mer Peptiden	69 \pm 6	132 \pm 15	0,02	0,13
	pTHamp-HPV16E7SH	54 \pm 2	145 \pm 7	0,003	0,18
B637	35mer Peptiden	44 \pm 22	153 \pm 17	0,02	0,22
	pTHamp-HPV16E7SH	54 \pm 17	130 \pm 11	0,03	0,15

¹ Anzahl der Spots in der Kontrollreaktion der T-Zellen gegen mit Humanalbumin beladene DC \pm Standardabweichung aus Triplikaten

² Anzahl der Spots in der spezifischen Reaktion der T-Zellen gegen den HPV16E7 35mer Peptidpool \pm Standardabweichung aus Triplikaten

³ Ergebnis des Students t-Test, Vergleich spezifische Reaktion gegen Kontrollreaktion

⁴ Frequenz der spezifisch INF- γ sezernierenden T-Zellen, berechnet aus der Anzahl der Spots

In Tab. 3.2.5 wurde gezeigt, dass in den pTHamp-HPV16E7SH induzierten Linien eine bedeutend größere Anzahl an CD8⁺ T-Zellen gefunden wurde. Interessant war es in diesem Zusammenhang zu untersuchen, ob ein höherer Anteil an CD8⁺ T-Zellen auch zu einer höheren Frequenz an spezifischen CD8⁺ T-Zellen führt. Vergleicht man die Frequenzen der Peptid- und DNA-induzierten T-Zelllinien eines Donors miteinander, so findet man in zwei der drei auswertbaren Donoren (B614 und B635) tatsächlich höhere Frequenzen an spezifisch INF- γ sezernierenden T-Zellen. Bei Donor B637 ist das nicht der Fall, obwohl auch bei diesem Donor über 70% CD8⁺ T-Zellen in der Kultur gefunden wurden (vgl. Tab 3.2.5). Ein zusätzliches Problem bei der Beurteilung der Ergebnisse des ELISpots ist die Tatsache, dass für den Assay die gesamte T-Zellpopulation einer Linie eingesetzt wurde, anstatt die CD8⁺ T-Zellen mittels MACS zu isolieren. Folglich kann die gestellte Frage, ob wir tatsächlich eine höhere Anzahl spezifischer CTL durch DNA-Priming erreichen nicht endgültig geklärt werden. Es scheint aber in der Tendenz tatsächlich so zu sein, dass auch die Frequenz der spezifischen CTL in den DNA-induzierten T-Zelllinien höher ist, als in den Peptid-induzierten T-Zelllinien.

3.2.5.5 Generierung von pTHamp-HPV16E7WT und –SH induzierten Linien

In der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Versuchsgruppe waren T-Zellen eines Donors jeweils mit pTHamp-HPV16E7SH und HPV16E7 35mer Peptiden generiert worden, um einen Vergleich zwischwischen der Immunogenität der beiden Antigene zu ermöglichen. In einer weiteren Versuchsreihe sollte nun ein Vergleich der Immunogenität zwischen pTHamp-HPV16E7WT und –SH erfolgen. Von vier gesunden HLA-A2 positiven Donoren (B700, B704, B705 und B706) wurden hierzu die Zellen isoliert und von jedem Donor parallel eine Linie in der schon beschriebenen Weise mit pTHamp-HPV16E7WR und pTHamp-HPV16E7SH generiert. Diese T-Zelllinien wurden phänotypisiert und im CFSE Proliferationsassay, sowie im INF- γ ELISpot auf das Vorhandensein einer spezifischen Immunantwort auf HPV16E7 Wildtyppeptide untersucht. Folgende Veränderungen zur vorhergehenden Versuchsreihe wurden vorgenommen: Im ELISpot sollten ausschließlich durch MACS isolierte CD8⁺ T-Zellen eingesetzt werden, um eine Messung der INF- γ Produktion der CD4⁺ auszuschalten. Die bei dieser Isolation anfallenden CD4⁺ T-Zellen wurden im ³H-Proliferationsassay eingesetzt, der bisher schon in der Allo-MLR angewandt wurde (vgl. Abs. 3.2.3). Im CFSE-Proliferationsassay wurde, wie bisher, die gesamte T-Zellpopulation eingesetzt. Des Weiteren sollten die generierten T-Zelllinien auf eine spezifische Reaktion der drei bekannten HLA-A2 restringierten CTL-Epitope E7₁₁₋₂₀, E7₈₂₋₉₀ und E7₈₆₋₉₃ untersucht werden, um Informationen über die Häufigkeit der Reaktion auf diese Einzelepitope zu erhalten. Bisher waren diese Epitope nur im Pool eingesetzt worden.

3.2.5.6 Phänotypisierung der pTHamp-HPV16E7SH und –WT induzierten T-Zelllinien

Nach Ende der dreiwöchigen Ruhephase wurden die T-Zellkulturen durchflusszytometrisch phänotypisiert, bevor sie im Proliferationsassay und ELISpot weiter untersucht wurden. Bei diesen Linien war die Verschiebung der Zusammensetzung der T-Zellpopulation in Richtung CD8⁺ T-Zellen nicht so stark ausgeprägt, wie es bei den DNA-induzierten Linien der Donoren B614-B637 der Fall war. Es dominierten aber auch hier durchgängig die DC8⁺ T-Zellen in den Linien. Der Aktivierungsmarker CD25 wird in sehr unterschiedlichem Maße von den T-Zellen der einzelnen Linien exprimiert. Insgesamt zeigten nur etwa 20% der T-Zellen CD25. Die Verteilung auf die T-Zelltypen zeigt keine Tendenz.

Tabelle 3.2.8: Phänotypisierung der DNA-induzierten T-Zelllinien der Donoren B700, B704, B705 und B706

T-Zelllinie	% positiver Zellen					
	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD25 ⁺	CD4 ⁺ /25 ⁺	CD8 ⁺ /25 ⁺	CD56 ⁺
B700 WT	45,68	57,17	21,51	7,05	21,23	7,36
B700 SH	37,81	59,51	26,65	6,85	24,15	3,62
B704 WT	49,74	53,9	15,68	16,13	12,16	3,04
B704 SH	41,69	61,31	22,06	21,17	17,39	11,78
B705 WT	29,35	72,06	22,67	20,6	9,74	7,45
B705 SH	40,82	66,39	22,17	16,46	12,96	7,75
B706 WT	27,98	63,22	25,61	10,31	18,5	7,52
B706 SH	23,99	67,13	20,76	8,82	18,42	11,27

3.2.5.7 Spezifische Proliferation der pTHamp-HPV16E7WT und –SH induzierten T-Zelllinien im CFSE-Proliferationsassay

Im CFSE-Proliferationsassay wurde die gesamte T-Zellpopulation untersucht. Zur Restimulation wurden zum einen mit 35mer Peptidpool beladene DC eingesetzt, da dieser Pool die Gesamtheit der potentiellen T-Zellepitope enthält.

Pro Ansatz wurden 1×10^5 T-Zellen und 1×10^4 Stimulatoren eingesetzt. Die Messung erfolgte am 5. Tag nach Ansetzen des Assays. Die statistische Auswertung erfolgte wie vorher beschrieben.

In drei der 8 Linien wurde spezifische Proliferation der CD4⁺ T-Zellen gegen den 35mer Peptidpool gefunden (B700WT, B704SH und B706WT). Drei von acht Linien zeigten spezifische Proliferation der CD8⁺ auf den Peptidpool (B704WT, B704SH und B705WT). Die spezifische Proliferation auf CTL-Epitope wurde auch in solchen Linien gefunden, die auf den 35mer Peptidpool nicht spezifisch reagieren. Allerdings muss der 35mer Peptidpool, der hier als Positivkontrolle dienen sollte im Gegensatz zu den 9mer Peptiden von den DC zunächst prozessiert werden. In diesem Proliferationsassay zeigten 14 von 16 untersuchten T-Zelllinien zumindest den Trend zu spezifische Proliferation. (Tab. 3.2.9). Wenn diese Ergebnisse auch nicht statistisch abzusichern waren, so kann dieses Ergebnis zumindest als Hinweis dafür dienen, dass eine Induktion einer spezifischen Immunantwort in diesen T-Zelllinien durch pTHamp-HPV16E7WT und –SH stattgefunden hat.

Tabelle 3.2.9: Zusammenfassung der Ergebnisse des CFSE-Proliferationsassays der Linien B700-B706.

		E7 35mer Pool			E7 ₁₁₋₂₀			E7 ₈₂₋₉₀			E7 ₈₆₋₉₃		
Linie		Co ¹	spez ²	p% ³	Co ¹	spez ²	p% ³	Co ¹	spez ²	p% ³	Co ¹	spez ²	p% ³
B700 WT	CD4	465 ±9	425 ±13	0,010	396 ±3	393 ±2	-	396 ±3	392 ±3	-	396 ±3	422 ±15	-
	CD8	787 ±9	761 ±26	0,38	760 ±13	668 ±7	0,009	760 ±13	706 ±3	0,009	760 ±13	819 ±35	-
B700 SH	CD4	349 ±67	295 ±4	0,39	295 ±1	293 ±6	-	295 ±1	292 ±78	-	295 ±1	305 ±9	-
	CD8	334 ±22	302 ±8	0,20	316 ±33	250 ±1	0,041	316 ±33	341 ±96	0,10	316 ±33	359 ±27	-
B704 WT	CD4	219 ±7	222 ±1	-	208 ±7	225 ±1	-	208 ±7	215 ±3	-	208 ±7	219 ±3	-
	CD8	394 ±5	359 ±14	0,048	362 ±20	363 ±20	-	362 ±20	350 ±11	-	362 ±20	219 ±3	0,034
B704 SH	CD4	324 ±9	282 ±12	0,009	315 ±12	304 ±12	-	315 ±12	299 ±24	-	315 ±12	317 ±13	-
	CD8	571 ±12	511 ±29	0,028	586 ±18	557 ±28	0,216	586 ±18	515 ±16	0,020	586 ±18	597 ±50	-
B705 WT	CD4	177 ±16	172 ±7	0,625	170 ±3	148 ±13	-	170 ±3	165 ±10	-	170 ±3	176 ±5	-
	CD8	260 ±11	237 ±5	0,047	237 ±3	200 ±32	0,244	237 ±3	247 ±21	-	237 ±3	208 ±10	0,031
B705 SH	CD4	190 ±10	180 ±20	0,213	169 ±20	160 ±3	-	169 ±20	159 ±7	-	169 ±20	150 ±15	-
	CD8	268 ±5	249 ±24	0,243	251 ±10	245 ±21	0,698	251 ±10	231 ±15	0,201	251 ±10	231 ±3	0,109
B706 WT	CD4	529 ±15	479 ±14	0,014	534 ±21	497 ±17	-	534 ±21	503 ±9	-	534 ±21	539 ±15	-
	CD8	697 ±58	687 ±8	0,799	869 ±38	711 ±23	0,003	869 ±38	779 ±48	0,062	869 ±38	829 ±79	-
B706 SH	CD4	278 ±23	246 ±11	0,116	259 ±7	246 ±10	-	259 ±7	249 ±14	-	259 ±7	269 ±25	-
	CD8	283 ±28	255 ±10	0,198	295 ±6	255 ±12	0,007	295 ±6	266 ±10		295 ±6	333 ±12	-

¹mittlere Fluoreszenz (mean all) der Kontrollreaktion der T-Zellen gegen mit Humanalbumin für den 35mer Peptidpool und HPV16E6₂₈₋₃₆ für die 9mere beladenen DC ± Standardabweichung aus Triplikaten

²mittlere Fluoreszenz (mean all) der spezifischen Reaktion der T-Zellen gegen den HPV16E7 35mer Peptidpool oder die CTL-Epitope ± Standardabweichung aus Triplikaten

³Ergebnis des Students t-Test, Vergleich spezifische Reaktion gegen Kontrollreaktion

Als signifikant spezifisch bewertete Reaktionen wurden fett gedruckt

Zum anderen wurden DC mit den drei bekannten HLA-A2 restringierten HPV16 CTL-Epitopen eingesetzt.

3.2.5.8 Spezifische Proliferation der CD4⁺ T-Zellen in den pTHamp-HPV16E7WT und -SH induzierten T-Zelllinien im ³H-Proliferationsassay

Im ³H-Proliferationsassay wurden ausschließlich CD4⁺ T-Zellen eingesetzt, die aus der CD8⁺ Selektion gewonnen wurden. Die Reinheit der selektierten Zellen war zuvor fluoreszenzcytometrisch überprüft worden und lag in allen Fällen über 95%. Getestet wurde auf das Vorhandensein einer spezifischen Proliferation nach Restimulation mit dem

HPV16E7 35mer Peptidpool. Als Kontrollreaktion wurde die Proliferation auf Humanalbumin getestet. Als Stimulatoren wurden DC eingesetzt.

Mit dem ^3H -Proliferationsassays konnte keine spezifische Reaktion gegen HPV16E7 Peptid in den DNA-induzierten T-Zelllinien gefunden werden (Tab. 3.2.10). Nur in vier Linien war die Proliferation höher als in der Kontrolle. Die statistische Auswertung mittels Students t-Test zeigte aber, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Proliferation in der Kontrollreaktion und der Proliferation gegen das spezifische Antigen bestanden.

Tabelle 3.2.10: Ergebnisse des ^3H -Proliferationsassay der CD4^+ T-Zellen nach DNA-Induktion.

T-Zelllinie	Co ¹ (cpm)	spez. Reakt. ² (cpm)	p% ³
B700 WT	14224±3638	11303±1360	-
B700 SH	11814±1351	11491±791	0,74
B704 WT	20198±3156	18868±2688	-
B704 SH	15878±1762	15734±2304	0,85
B705 WT	24711±528	23874±3171	0,10
B705 SH	25845±5615	25182±1939	0,72
B706 WT	8196±773	7957±1268	-
B706 SH	11851±1042	12293±394	-

¹ Mittelwert *counts per minute* (cpm) der Kontrollreaktion gegen Humanalbumin ± Standardabweichung aus Triplikaten

² Mittelwert *counts per minute* (cpm) der spezifischen Reaktion gegen den HPV16E7 35mer Peptidpool ± Standardabweichung aus Triplikaten

³ Ergebnis des Students t-Test, Vergleich der spezifischen Reaktion mit der Kontrollreaktion

3.2.5.11 Spezifische $\text{INF-}\gamma$ Freisetzung der CD8^+ T-Zellen

Der $\text{INF-}\gamma$ ELISpot wurde mit den selektierten CD8^+ T-Zellen durchgeführt. Die selektierte Kultur wurde vor Ansetzen des Assays durchflusszytometrisch auf ihre Reinheit überprüft. Sie lag in allen Fällen über 95%. Als Stimulatoren wurden peptid-peladene DC eingesetzt. Es wurden die gleichen Antigene und Kontrollen verwendet, wie auch schon im CFSE-Proliferationsassay. Pro Reaktion wurden 2×10^4 Effektoren und 2×10^3 Stimulatoren genommen. Im $\text{INF-}\gamma$ ELISpot zeigten drei der vier Donoren (B700, B704, B705) spezifische $\text{INF-}\gamma$ Sekretion, wenn die Linien mit pTHamp-HPV16E7WT generiert wurden (Tab. 3.2.11 A). In drei der vier Donoren (B700, B705 und B706) konnten mit pTHamp-HPV16E7SH generierte HPV16E7 spezifische CTL-Antworten gefunden werden. Hierbei muss die Beobachtung erwähnt werden, dass die Viabilität der CD8^+ Zellen der Linie B704SH sehr schlecht war, wie mikroskopisch feststellbar war. Dies wurde bei den T-Zellen der Donoren B700 und B706, die auch mit sehr niedriger Spot-Zahl im ELISpot reagierten, nicht beobachtet. Die mitgeführte Positivkontrolle, bei der die T-Zellen

unspezifisch mit CD3/CD28 Dynalbeads stimuliert werden, zeigen für die eben erwähnten Linien Mittelwerte von etwa 300-400 Spots/Well (Daten sind in der Tab. nicht enthalten). In der Positivkontrolle der Linie B704SH wurden im Mittel 50 Spots gefunden. Die Ergebnisse dieser Linie wurden deshalb als nicht auswertbar angenommen. Anhand des Verhältnisses der gefundenen Spots zur Zahl der eingesetzten T-Zellen wurde die Frequenz der spezifisch INF- γ sezernierenden CTL ermittelt. Die gefundenen Frequenzen an E7 spezifischen CTL in den E7SH-induzierten Linien lagen im Vergleich zu der E7WT-induzierten Linie um 23%, bzw. um 39% höher. Dazu dieser Aussage nur die Linien zweier Donoren herangezogen werden können und keine Reproduktion der Ergebnisse durchgeführt wurde, kann nicht eindeutig geklärt werden, ob die Immunogenität des E7SH tatsächlich höher ist als die des E7WT. Die Reaktion der CTL auf die HLA-A2 restringierten E7 9mere sah folgendermaßen aus: In den Linien des Donors B706 war keine E7-spezifische INF- γ Sekretion nachzuweisen. Die 5/8 Linien reagierten sowohl auf E7 11-20 als auch auf E7 82-93. Zwei von ihnen reagieren zusätzlich spezifisch auf E7 86-93 (Tab. 3.2.11 B).

Tab. 3.2.11 A und B: INF- γ ELISpot der pTHamp-HPV16E7WT und -SH-induzierten Linien B700-B706

Tabellenteil A Reaktion gegen den 35mer Peptidpool

A		Co ¹	E7 35mer ²	p% ³	Frequenz % ⁴
B700	WT	29±3	54±11	0,018	0,13
	SH	35±5	66±15	0,026	0,16
B704	WT	240±15	359±14	0,001	0,59
	SH	55±8	46±15	-	-
B705	WT	163±29	218±23	0,048	0,28
	SH	230±11	310±12	0,001	0,39
B706	WT	14±8	11±12	-	-
	SH	20±5	32±8	0,045	0,06

¹ Anzahl der Spots in der Kontrollreaktion der T-Zellen gegen mit Humanalbumin oder HPV16E6₂₈₋₃₆ beladene DC ± Standardabweichung aus Triplikaten

² Anzahl der Spots in der spezifischen Reaktion der T-Zellen gegen den HPV16E7 35mer Peptidpool oder den CTL-Epitopen ± Standardabweichung aus Triplikaten

³ Ergebnis des Students t-Test, Vergleich spezifische Reaktion gegen Kontrollreaktion

⁴ Frequenz der spezifisch INF- γ sezernierenden T-Zellen, berechnet aus der Anzahl der Spots. Als signifikant spezifisch gewertete Reaktionen wurden grau unterlegt.

Tabellenteil B Reaktion gegen die 9mer Einzelpeptide

B		Co ¹	E7 11-20 ²	p % ³	Fr % ⁴	E7 82-90 ²	p% ³	Fr % ⁴	E7 86-93 ²	p % ³	Fr % ⁴
B700	WT	22±4	33±1	0,037	0,05	43±6	0,031	0,1	31±9	0,276	-
	SH	40±4	64±10	0,019	0,12	62±5	0,003	0,11	39±7	0,664	-
B704	WT	240±1 0	350±19	0,001	0,5	336±21	0,001	0,47	291±33	0,26	-
	SH	45±1	35±7	-	-	41±19	-	-	41±4	-	-
B705	WT	157±1 0	216±26	0,022	0,29	188±10	0,016	0,16	196±24	0,012	0,2
	SH	202±1 2	308±20	0,001	0,5	304±28	0,004	0,5	250±27	0,048	0,3
B706	WT	20±4	13±1	-	-	9±7	-	-	11±4	-	-
	SH	29±5	15±6	-	-	11±11	-	-	13±1	-	-

3.3 In vitro Experimente mit CAP-E7SH und CAP-E7WT mRNA

3.3.1. Optimierung der Transfektion von dendritischen Zellen mit mRNA

Die Transfektion der dendritischen Zellen mit CAP-E7 mRNA sollte ebenfalls mit der Amaxa-Technologie vollzogen werden. Bei der Transfektion der DC mit DNA (vgl. Kap. 3.2) konnten schon umfangreiche Kenntnisse über die Transfizierbarkeit der DC mit der Amaxa-Technologie an sich gewonnen werden. Wichtige Erkenntnisse waren das Ausbleiben der terminalen Differenzierung von unreif transfizierten DC, gute Transfizierbarkeit von bereits ausdifferenzierten DC und deren Eignung als Stimulatoren für T-Zellen in *in vitro* Experimenten. Es wurde ein optimiertes Protokoll für die Transfektion von DC mit DNA erstellt. Dieses bereits erarbeitete Wissen sollte die Basis für die Optimierung der Transfektion mit mRNA sein.

3.3.1.1 Vergleich DNA und RNA Transfektion, sowie Lipofektion von DC

In Hinblick auf die bereits gewonnen Erfahrungen mit der Transfektion von DC wurde ein umfangreiches Experiment entworfen, dass Antwort auf eine Reihe von Fragen geben sollte. Zum einen sollten die Transfektionseffizienzen und die Viabilität nach DNA und RNA-Transfektion unter gleichen Transfektionsbedingungen verglichen werden. Die Effizienz der Lipofektion mit DOTAP wurde bestimmt und es wurden Unterschiede zwischen der RNA-Transfizierbarkeit von unreifen und ausgereiften DC untersucht. Der zeitliche Verlauf der Expression wurde verfolgt.

Pro Transfektionsansatz wurden 2×10^6 DC mit 5 µg pCMV-EGFP oder CAP-EGFP mRNA transfiziert. Zur Lipofektion wurden 5 µg EGFP-mRNA mit 5 µg DOTAP vorkomplexiert und zu 2×10^6 DC in serumfreiem RPMI für drei Stunden beladen. Messung der EGFP-Expression erfolgte 8 h, 24 h und 48 h nach der Transfektion, bzw. Beladung. Durch Anfärbung mit Propidiumjodid wurde zusätzlich die Viabilität bestimmt.

In Abb. 3.3.1 sind die Ergebnisse dieses Experiments zusammengefasst. DNA-transfizierte Zellen zeigen hier schon nach 8 h eine hohe EGFP-Expression. Bereits nach 24 h ist die Expression deutlich niedriger. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zum in Abb. 3.2.2 dargestellten Expressionsverlauf. Dort wurde gezeigt, dass die EGFP-Expression der mit pCMV-EGFP transfizierten DC innerhalb von 48 h stetig zunimmt, was auch in mehreren Wiederholungen bestätigt worden war. Möglicherweise handelt es sich hier um donorspezifische Besonderheiten.

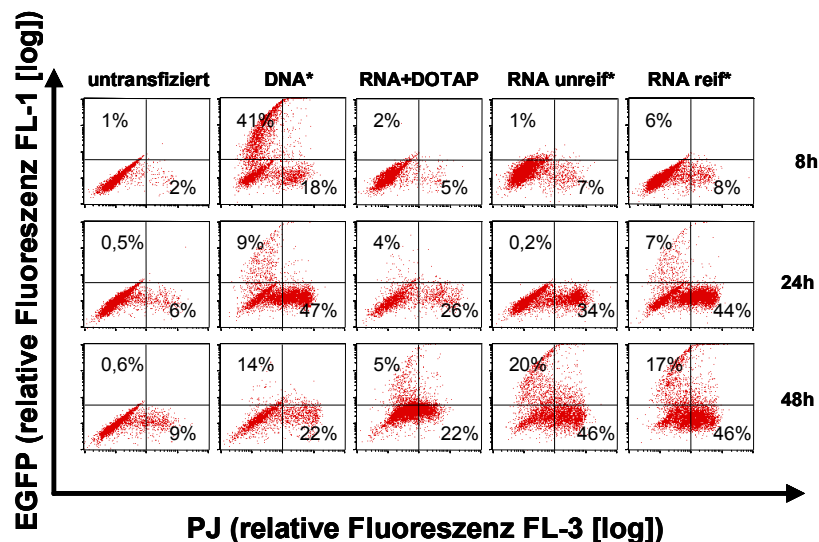


Abb. 3.3.1: Vergleich der Transfektionseffizienz und Viabilität nach DNA- und RNA-Transfektion, sowie Lipofektion über 48 h. Die DC wurden mit 5 µg pCMV-EGFP oder EGFP-mRNA transfiziert. Nach 8 h, 24 h und 48 h wurde ein Teil der DC mit PJ angefärbt und EGFP-Expression sowie PJ Anfärbung im Durchflusszytometer gemessen. Der prozentuale Anteil an EGFP exprimierenden (oberer linker Quadrant der Dot-Plots) und der toten Zellen (rechte Quadranten) wurden im Dot-Plot angegeben. Die Abb. zeigt das Ergebnis des Donors B697. Es konnte anhand der DC eines weiteren Donors bestätigt werden.

Mit Hilfe der Lipofektion konnten nur sehr geringe RNA-Aufnahmeraten erzielt werden. Nach 48 h waren nur 5% der DC EGFP-positiv. Auch die mittlere Fluoreszenz der Zellen war geringer als in den Transfektionsansätzen. Ausgereift und unausgereift transfizierte DC verhielten sich in diesem Experiment sehr ähnlich. Erst nach 48 h wurde die maximale EGFP-Transfektionsrate von 20% bzw. 17% erreicht. Auch die mittlere Fluoreszenz der DC ist erst nach 48 h hoch. Dieses Experiment zeigte, dass DC nach dem für die DNA-Transfektion optimierten Amaxa-Protokoll mit RNA transfizierbar waren. Diese Methode war der Lipofektion mit DOTAP überlegen, bei der nur sehr geringe Transfektionsraten erreicht wurden und vor allem die Expressionsintensitäten der positiven DC sehr gering war. Wie bei der Transfektion mit DNA fanden sich keine Unterschiede zwischen ausgereift und unausgereift transfizierten DC. Warum die erstellte Kinetik einen etwas untypischen Verlauf zeigte, konnte nicht eindeutig erklärt werden. Es wurde aber, wie

bereits in Kapitel 3.2.1 erwähnt, festgestellt, dass die Transfektionserfolge donorspezifisch schwanken. In diesem Experiment war erst 48 h nach der Transfektion mit RNA die Expression von EGFP nachweisbar. Die Lebensdauer von ausdifferenzierten DC ist allerdings auf wenige Tage begrenzt, so dass ein Einsatz nach 24 h nötig wäre, um eine ausreichende Anzahl guter Stimulatoren zu erhalten. Dieses nicht den Erwartungen entsprechende Ergebnis musste also in weiteren Experimenten überprüft werden.

3.3.1.2 Vergleich Amaxa-Transfektion und herkömmliche Elektroporation

In diesem Experiment wurde die Amaxa-Transfektionsmethode mit der herkömmlichen Transfektionsmethode mit dem BioRad Elektroporationsgerät verglichen. Für die Amaxa-Transfektion wurde das oben beschriebene Protokoll eingesetzt. In beiden Fällen wurden ausgereifte und unreife DC mit 5 µg RNA transfiziert. Da die DC aufgrund ihrer begrenzten Lebensdauer spätestens 24 h nach der Transfektion als Stimulatoren eingesetzt werden sollten, wurde die EGFP-Expression und die Viabilität der transfizierten DC nach 24 h gemessen. Wie in Abb. 3.3.2 zu sehen ist, verhielten sich die DC dieses Donors nach der Amaxa-Transfektion mit RNA nicht wie die im vorherigen Experiment. Bereits nach 24 h zeigte sich nach der Amaxa-Transfektion mit RNA eine EGFP-Expression von 32% für unreif transfizierte DC. Ausgereifte untransfizierte Zellen starben 17% der DC. Wurden die Zellen elektroporiert, konnten nur sehr geringe EGFP-Expressionsraten festgestellt werden. Es wurden nach 24 h 6% für unreif bzw. 2% für ausgereifte elektroporierte DC gefunden. Die Stärke der EGFP-Expression in den positiven DC war sehr gering. Die Elektroporation von DC stellt also keine Erfolg versprechende Alternative zur Amaxa-Transfektion dar. Das die mit RNA transfizierten DC in diesem Experiment bereits nach 24 h eine hohe EGFP-Expression zeigten, entspricht den Erfahrungen, die bereits mit der DNA-Transfektion gemacht worden waren. Da dieses Experiment mit einer sehr geringen Anzahl an DC durchgeführt worden war, war eine Messung der EGFP-Expression nach 48 h in diesem Fall nicht möglich gewesen. Sollte in einem weiteren Experiment bestätigt werden können, dass RNA-transfizierte DC bereits nach 24 h eine hohe Expression des transfizierten Antigens aufweisen, wäre ein Einsatz der DC als Stimulatoren 24 h nach der Transfektion möglich.

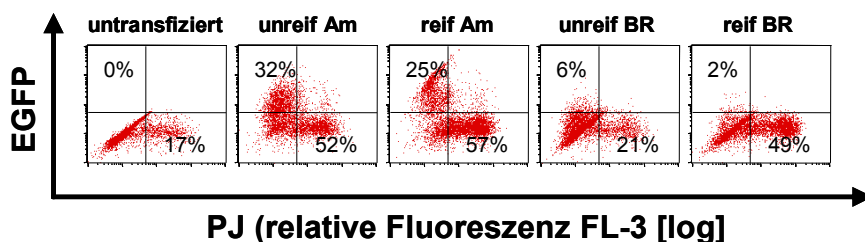


Abb. 3.3.2: Vergleich Transfektionsgeräte. Das Amaxa System (Am) wurde mit dem BioRad

Elektroporationsgerät (BR) verglichen. Zur Transfektion wurden jeweils 5 µg EGFP-RNA eingesetzt. Die Transfektionseffizienz wurde nach 24h gemessen. Vor der Messung wurden die Zellen mit PJ gefärbt, um die Viabilität zu bestimmen. Die Zahlen im oberen Feld der Grafiken stellen die Prozent EGFP-positiver Zellen dar. Die Prozentzahl im unteren Bereich steht für den Gesamtanteil Propidiumjodid positiver Zellen. Dieses Experiment zeigt das Ergebnis der Transfektion bzw. Elektroporation von zuvor eingefrorenen und wieder aufgetauten DC des Donors B698. Dieses Experiment war mit den DC eines weiteren Donors mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt worden.

3.3.1.3 Effizienz der Transfektion mit zwei verschiedenen RNA-Mengen.

Die bisher besprochenen Experimente zur Transfektion von dendritischen Zellen mit RNA hatten in Bezug auf den zeitlichen Verlauf der Expression des eingeführten Antigens widersprüchliche Ergebnisse geliefert. Es war also notwendig, in einem weiteren Experiment diese Ergebnisse zu überprüfen. Außerdem sollte geprüft werden, ob durch Erhöhung der eingesetzten RNA-Menge eine Steigerung der Transfektionseffizienz erreicht werden könnte. Eingefrorene und wieder aufgetaute DC von zwei Donoren wurden in unreifem und ausgereiftem Zustand mit 5 µg, wie bisher und mit 10 µg RNA transfiziert. Nach 24 h wurden die Transfektionseffizienz und die Viabilität der DC ermittelt. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abb. 3.3.3 dargestellt. Auch in diesem Experiment wurde bereits nach 24h EGFP Expression in den DC nachgewiesen. Eine Erhöhung der eingesetzten RNA-Menge führte zu keiner besseren Transfektionseffizienz. Die geringe Überlebensrate der DC, bei untransfizierten DC starben in der Kultur bereits 53% der Zellen, wurde damit erklärt, dass für dieses Experiment DC verwendet wurden, die bereits mehrere Monate bei -80°C gelagert worden waren. Die Transfektion von dendritischen Zellen mit RNA war nach den Ergebnissen dieser Versuchsreihe nach dem gleichen Protokoll möglich, dass für die DNA-Transfektion optimiert worden war. Die erreichten Effizienzen waren bei der RNA-Transfektion niedriger als die für die DNA-Transfektion ermittelten. Dort waren Transfektionseffizienzen von 25% und 55% gefunden worden (vgl. Abb. 3.2.3 und 3.2.4), wenn 5 µg DNA eingesetzt wurden. Für die Transfektion mit RNA waren es lediglich 17-25%. Durch regelmäßige Kontrollen der Transfektionseffizienzen auch während der folgenden Experimente war festgestellt worden, dass die Effizienzen der einzelnen Transfektionsansätze auch bei DC des gleichen Donors trotz sorgfältiger Durchführung der Experimente schwanken können. Auch Spizek et al. (2001) beschreiben diese Beobachtung bei der Transfektion von DC. Die Intensitäten der EGFP-Transfektion, die als mittlere Fluoreszenz (mean all) der Zellen gemessen wurde, war in den DNA-transfizierten Zellen höher als in den RNA-Transfektionsansätzen. Im pTHamp-Vektor waren die Gene unter der Kontrolle des hoch aktiven CMV-Promotors, so dass es möglicherweise in DNA-transfizierten DC zu einer Bildung von großen mRNA-Mengen und damit auch zu stärkerer Proteinbildung kam. Wie bei Gilboa (2004) beschrieben, muss eine stärkere Antigenexpression nicht zu einer

besseren Antigenpräsentation führen. In den folgenden Experimenten werden die als Stimulatoren eingesetzten DC nach demselben Protokoll transfiziert, das für die DNA-Transfektion optimiert wurde.

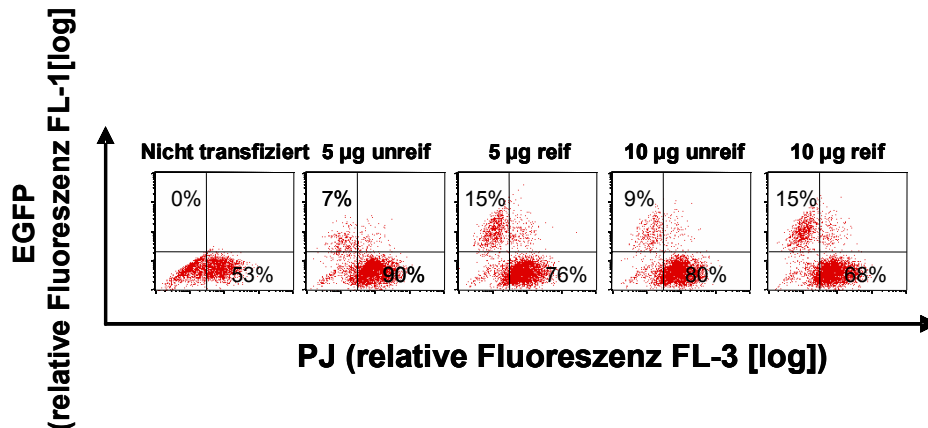


Abb. 3.3.3: Effizienz der Transfektion bei zwei EGFP-RNA Mengen. Die DC wurden nach Standardprotokoll transfiziert. Die Effizienz der Transfektion wurde nach 24 h am FACS gemessen. Die Proben wurden mit PJ gefärbt um die Viabilität der Zellen zu bestimmen. Die Zahlen im oberen Feld der Grafiken stellen die Prozent EGFP-positiver Zellen dar. Die Prozentzahl im unteren Bereich steht für den Gesamtanteil Propidiumjodid-positiver Zellen. Es wurde das Ergebnis des Donors B620 gezeigt. Es konnte anhand eines weiteren Donors mit vergleichbarem Ergebnis reproduziert werden.

3.3.2 Restimulation von HPV16E7WT-spezifischen T-Zelllinien mit HPV16E7 CAP-RNA transfizierten DC

Die in diesem Kapitel beschriebenen Experimente wurden analog zu den in Kapitel 3.2.4 beschriebenen geplant. Allerdings wurde versucht, einige zusätzliche Fragestellungen zu beantworten. Es wurden parallel die beiden Konstrukte E7WT und E7SH zur Restimulation verwendet. Des Weiteren wurde getestet, ob die von Nair et al. (1998) beschriebene passive Beladung von DC mit RNA als alternative Methode dendritische Zellen zu geeigneten Stimulatoren macht.

3.3.2.1 Vergleich des Stimulationspotentials von ausgereift und unreif RNA-transfizierten DC im INF- γ ELISpot

Mit den Zellen von 4 gesunden Donoren wurden HPV16E7 spezifische T-Zelllinien angelegt. Sie wurden mit den auf autologe DC geladenen 35mer Peptiden generiert.

Die Kulturen wurden hinsichtlich ihres Anteils an CD8⁺ T-Zellen mittels direkter Fluoreszenzanfärbung untersucht. Das Ergebnis ist in Tab. 3.3.1 dargestellt.

Die T-Zellen wurden im ELISpot auf Spezifität getestet. Als Stimulatoren wurden autologe DC eingesetzt, die nach dem oben beschriebenen Protokoll mit CAP-HPV16E7WT und –SH RNA beladen wurden. In der Kontrollreaktion wurden die DC mit CAP-EGFP RNA beladen. Als Positivkontrolle wurde die Reaktion der T-Zellen auf die E735mer Peptide

gemessen, die auch zur Generierung der T-Zelllinien eingesetzt wurden. Alle Ansätze wurden in Triplikaten gemacht. Pro Well wurden 2×10^4 T-Zellen und 2×10^3 DC eingesetzt.

Tab. 3.3.1 Bestimmung des Anteils der CD8⁺ T-Zellen in den HPV16E7 spezifischen Zellkulturen

Donor	CD8 ⁺ % ¹
B671	21
B672	15
B676	4
B678	10

¹ Anteil der CD8⁺ T-Zellen in %, ermittelt durch direkte Fluoreszenzfärbung mit α -CD8 Antikörper

Wie aus Tab. 3.3.2 ersichtlich konnte für die drei getesteten Linien B672, B676 und B678 gezeigt werden, dass sie nach dreimaliger Stimulierung mit HPV16E7 35mer Peptiden spezifische T-Zellen gegen dieses Antigen enthalten. Die INF- γ Sekretion nach Restimulation mit RNA transfizierten DC ist in Tab. 3.3.3 dargestellt.

Von den vier getesteten T-Zelllinien wurde nur bei einer (Donor B676) eine signifikant spezifische Reaktion auf das Antigen nach Restimulation mit RNA-transfizierten dendritischen Zellen gefunden. Die mit ausgereift transfizierten DC restimulierten T-Zellen reagierten hoch signifikant spezifisch, wenn sie mit E7WT oder E7SH RNA restimuliert wurden. Die T-Zellen dieses Donors, die mit unausgereift transfizierten

Tab. 3.3.2: spezifische INF- γ Sekretion der HPV16E7 spezifischen T-Zelllinien nach Restimulation mit dem E7 35mer Peptidpool

Donor	peptidbeladene DC als Stimulatoren			
	Co ¹	spezif ²	p % ³	% ⁴
B671	n. d.	n.d.	n. d.	n.d.
B672	59 \pm 3	183 \pm 6	0,001	0,62
B676	135 \pm 23	213 \pm 1	0,02	0,39
B678	11,3 \pm 4	43 \pm 10	0,008	0,16

¹ Mittelwert \pm Standardabweichung, Spotzahl in der Kontrollreaktion nach Restimulation mit humanalbuminbeladenen DC

² Mittelwert \pm Standardabweichung, Spotzahl nach Restimulation mit E7 35mer Peptidpool beladenen DC

³ Ergebnisse des Students t-Tests zur Bestimmung der Signifikanz des Unterschieds zwischen der Kontrollreaktion und der spezifischen Reaktion

⁴ Prozent spezifischer T-Zellen in der Kultur

n. d.: nicht durchgeführt

Tab. 3.3.3: Spezifische INF- γ Sekretion der HPV16E7 spezifischen T-Zelllinien nach Restimulation mit CAP-E7WT und -SH transfizierten DC, Vergleich zwischen ausgereift und unreif transfizierten DC

Donor	restim. mit	unreif transfizierte DC als Stimulatoren				ausgereift transfizierte DC als Stimulatoren			
		Co ₁	spezif ²	p % ₃	% ₄	Co ₁	spezif ₂	p % ₃	% ₄
B671	E7 WT	193±21	100±2	-	-	230±1	263±27	0,2	-
	E7SH	193±21	136±15	-	-	230±1	239±5	0,2	-
B672	E7WT	68±11	92±37	0,4	-	79±12	88±40	0,7	-
	E7SH	68±11	77±50	0,8	-	79±12	90±22	0,1	-
B676	E7WT	21±2	28±4	0,5	-	24±4	101±21	0,009	0,4
	E7SH	21±2	6±6	-	-	24±4	90±12	0,0009	0,34
B678	E7WT	22±8	39±26	0,4	-	18±9	38±11	0,2	-
	E7SH	22±8	31±10	0,3	-	18±9	15±7	-	-

¹ Mittelwert \pm Standardabweichung, Spotzahl in der Kontrollreaktion nach Restimulation mit CAP-EGFP transfizierten DC

² Mittelwert \pm Standardabweichung, Spotzahl nach Restimulation mit CAP-E7WT oder -SH RNA transfizierten DC

³ Ergebnisse des Students t-Tests zur Bestimmung der Signifikanz des Unterschieds zwischen der Kontrollreaktion und der spezifischen Reaktion

⁴ Prozent spezifischer T-Zellen in der Kultur

Die als signifikant spezifisch definierten Ansätze wurden grau unterlegt

DC restimuliert wurden, reagieren nicht mit spezifischer INF- γ Freisetzung. Die T-Zelllinien des Donors B671 zeigen nach Restimulation mit ausgereift transfizierten DC zwar höhere Spotzahlen, aber es konnte keine Signifikanz für die Spezifität der Reaktion nachgewiesen werden. Bei den T-Zelllinien der Donoren B672 und B678 waren keine Unterschiede in der Spotzahl zwischen unreif und ausgereift transfizierten DC zu finden.

Somit konnte mit Hilfe des INF- γ ELISpots nicht eindeutig nachgewiesen werden, dass die RNA-transfizierten DC ebenso geeignete Stimulatoren für wildtypspezifische T-Zellen darstellen, wie die mit DNA transfizierten (vgl. Kapitel 3.2.4 und Abb. 3.2.2). Es konnte ebenfalls kein überzeugender Unterschied zwischen ausgereift und unreif transfizierten dendritischen Zellen gefunden werden. Dieser ELISpot war insgesamt zweimal mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt worden.

3.3.2.2 Vergleich des Stimulationspotentials von ausgereift und unreif RNA-transfizierten DC im CFSE-Proliferationsassay

Während der INF- γ ELISpot die Reaktion der CD8⁺ T-Zellen zeigt, können mit dem CFSE-Proliferationsassay sowohl CD8⁺ als auch die CD4⁺ T-Zellen beurteilt werden. Da in peptidgenerierten Linien die CD4⁺-Antwort stärker ist, als die der CD8⁺ wurde erwartet, dass mit Hilfe dieses Assays die Fähigkeit der RNA-transfizierten DC, die spezifischen Zelllinien zu restimulieren, besser dargestellt werden konnte.

Der CFSE-Proliferationsassay wurde am selben Tag wie der ELISpot durchgeführt. Es

wurden drei der vier Linien, die im ELISpot getestet worden waren, überprüft. Für den Donor B672 standen nicht genügend Stimulatoren zur Verfügung. Die Messung der Proliferation am Durchflußzytometer erfolgte am 5. Tag nach Ansetzen des Assays. Durch eine direkte Anfärbung mit α -CD8⁺ Antikörper konnten die T-Zelltypen getrennt beurteilt werden.

Tab. 3.3.4 Spezifische Proliferation der HPV16E7-35mer peptidspezifischen Linien nach Restimulation mit HPV16E7 35mer peptidbeladenen DC

Donor		peptidbeladene DC als Stimulatoren		
		mean Co ¹	mean spezif ²	p % ³
B671	CD4 ⁺	1159±31	501±6	0,0006
	CD8 ⁺	1181±34	1044±1	0,6
B676	CD4 ⁺	581±25	460±51	0,03
	CD8 ⁺	1036±53	933±27	0,04
B678	CD4 ⁺	1086±28	450±6	0,0009
	CD8 ⁺	1740±54	1437±66	0,02

¹ Mittelwert ± Standardabweichung aus Triplikaten, mittlere Fluoreszenz (mean all) der Kontrollreaktion mit humanalbuminbeladenen DC als Stimulatoren.

² Mittelwert ± Standardabweichung aus Triplikaten, mittlere Fluoreszenz (mean all) der spezifischen Reaktion mit HPV16E7 35mer beladenen DC.

³ Ergebnisse des Students t-Tests zur Bestimmung der Signifikanz des Unterschieds zwischen der Kontrollreaktion und der spezifischen Reaktion.

grau unterlegt wurden die als signifikant positiv bewerteten Reaktionen

Wie aus Tab. 3.3.4 ersichtlich wurde im CFSE-Proliferationsassay eine signifikant spezifische Reaktion der CD4⁺ positiven T-Zellen in allen drei untersuchten Linien gefunden werden. Nur bei Donor B671 konnte keine spezifische Reaktion der CD8⁺-T-Zellen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sollten als Positivkontrolle für die in Tab. 3.3.5 dargestellten Ergebnisse der Restimulation dieser Linien mit den RNA-gepulsten dendritischen Zellen dienen. Keine der unreif transfizierten DC restimulieren die spezifischen T-Zelllinien effektiv. Nur in zwei Fällen ist die Proliferation der spezifischen Ansätze höher als in der Kontrollreaktion, so dass eine statistische Beurteilung sinnvoll war (Donor B678). In den T-Zelllinien der Donoren B671 und B676 reagieren sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen mit spezifischer Proliferation auf die Restimulation mit E7WT und E7SH RNA-transfizierten DC. Bei den Zellen des Donors B678 zeigte sich zwar eine spezifische Reaktion auf mit HPV16E7WT RNA beladene DC, aber es konnte keine spezifische Proliferation mit HPV16E7SH RNA gefunden werden. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass nur ausgereift transfizierte DC als Stimulatoren geeignet waren. Nach Restimulation mit E7WT-RNA proliferieren bei 3/3 Donoren die CD4⁺ T-Zellen spezifisch und bei 2/3 auch die CD8⁺. Bei Restimulation der wildtypspezifischen Linien mit E7SH-RNA reagieren 2/3 Linien mit spezifischer Proliferation sowohl der CD8⁺ als auch

der CD4⁺ T-Zellen. Das Ergebnis des CFSE-Proliferationsassays stimmt gut mit den Ergebnissen der Restimulationsexperimente mit DNA-transfizierten DC überein (vgl. Kapitel 3.2.4, vor allem Tab. 3.2.3). Mit Hilfedes INF- γ ELISpots konnte das allerdings nicht bestätigt werden. Betrachtet man die Anteile an CD8⁺ T-Zellen in den Kulturen, die in Tab. 3.3.1 gezeigt werden, lässt sich vermuten, dass in den Versuchsansätzen des ELISpots zu wenig CD8⁺ Zellen enthalten waren, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten. Es gab keine Hinweise darauf, dass E7SH oder E7WT beladenen DC sich in ihrer Fähigkeit als Stimulatoren unterscheiden.

Tab. 3.3.5 spezifische Proliferation der HPV16E7 35mer peptidspezifischen Linien nach Restimulation mit HPV16E7WT und –SH RNA beladenen DC

			unreif transfigierte DC als Stimulatoren			ausgereift transfigierte DC als Stimulatoren		
Donor	restim. mit		mean Co ¹	mean spezif ²	p% ³	mean Co ¹	mean spezif ²	p% ³
B671	E7WT RNA	CD4 ⁺	211 ±7	324 ±45	-	368 ±1	174 ±2	1,6x10⁻⁶
		CD8 ⁺	338 ±10	350 ±24	-	477 ±4	303 ±10	2x10⁻⁴
	E7SH RNA	CD4 ⁺	211 ±7	358 ±34	-	368 ±1	272 ±32	0,03
		CD8 ⁺	338 ±10	356 ±28	-	477 ±4	363 ±12	0,001
B676	E7WT RNA	CD4 ⁺	227 ±1	226 ±5	-	226 ±1	166 ±10	0,004
		CD8 ⁺	411 ±13	385 ±7	0,2	406 ±1	292 ±19	0,004
	E7SH RNA	CD4 ⁺	227 ±1	241 ±3	-	226 ±1	176 ±10	0,007
		CD8 ⁺	411 ±13	367 ±24	0,2	406 ±1	350 ±6	0,001
B678	E7WT RNA	CD4 ⁺	192 ±1	285 ±40	-	196 ±8	184 ±1	0,04
		CD8 ⁺	296 ±1	388 ±54	-	325 ±30	308 ±20	0,08
	E7SH RNA	CD4 ⁺	192 ±1	479 ±36	-	196 ±8	206 ±14	-
		CD8 ⁺	296 ±1	559 ±27	-	325 ±30	344 ±47	-

¹ Mittelwert ± Standardabweichung aus Triplikaten, mittlere Fluoreszenz (mean all) der Kontrollreaktion mit EGFP-RNA transfizierten DC als Stimulatoren.

² Mittelwert \pm Standardabweichung aus Triplikaten, mittlere Fluoreszenz (mean all) der spezifischen Reaktion mit E7WT oder -SH-RNA transfizierten DC.

³ Ergebnisse des Students t-Tests zur Bestimmung der Signifikanz des Unterschieds zwischen der Kontrollreaktion und der spezifischen Reaktion
grau unterlegt wurden die als signifikant positiv bewerteten Reaktionen

3.3.2.3 Untersuchung des Restimulationspotentials von passiv mit RNA beladenen DC

Die passive Beladung von DC mit RNA wird in der Literatur als eine alternative, sehr effektive Beladungsmethode zur Lipofektion und Elektroporation beschrieben (Boczkowski et al., 1996; Ashley et al., 1997; Nair et al., 1998), obwohl nach der Transfektion von EGFP-RNA keine Fluoreszenz in der durchflusszytometrischen Analyse möglich ist (Strobel et al., 2000; van Tendeloo et al., 2001). In einem kleinen Nebenprojekt sollte die Effizienz dieser Methode mit der Amaxa-Transfektion von RNA verglichen werden.

Zunächst wurden 1×10^5 DC mit 5 μ g EGFP RNA für 4 h in CellGro beladen, zweimal gewaschen und in CellGro mit Zusatz von IL-4, GM-CSF und Zytokincocktail ausdifferenziert. Nach 24 h wurden sie durchflusszytometrisch vermessen. Zur Kontrolle wurden DC vermessen, die über den gleichen Zeitraum kultiviert wurden, denen aber keine RNA zugesetzt worden war. Es konnte wie in Abb. 3.3.4 dargestellt keine Expression von EGFP nachgewiesen werden.

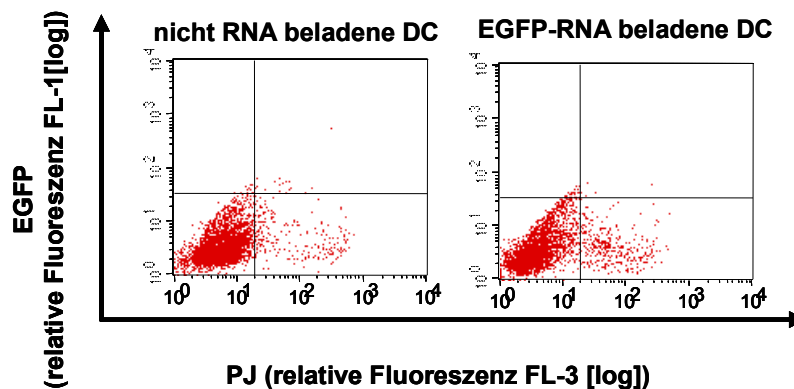


Abb. 3.3.4: Durchflusszytometrische Analyse von passiv mit CAP-EGFP-RNA beladenen DC. Ausgereifte DC wurden für 4h mit der RNA inkubiert und anschließend zweimal gewaschen und für weitere 24 h in CellGro kultiviert, bevor sie am Durchflusszytometer auf EGFP-Expression untersucht wurden. Zur Bestimmung der Vitalität der Zellen wurde PJ gefärbt. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte DC.

Die T-Zellen der in den vorhergehenden Experimenten eingesetzten Zelllinien wurden parallel zu den oben beschriebenen Experimenten mit passiv beladenen DC restimuliert. Die autologen DC der T-Zelllinien wurden passiv mit HPV16E7WT CAP- und HPV16E7SH CAP-RNA in derselben Weise, wie schon für EGFP beschrieben, beladen und als Stimulatoren im INF- γ ELISpot und im CFSE-Proliferationsassay eingesetzt.

In dem ELISpot, der mit passiv RNA-beladenen DC als Stimulatoren durchgeführt wurde, war die gleiche Zelllinie positiv die auch auf die Restimulation mittels Amaxa-Technologie transfizierten DC positiv reagiert hatte (vgl. Tab. 3.3.6 und 3.3.3). Die aus der Spotzahl errechneten Frequenzen an spezifischen CD8⁺-Zellen in der T-Zelllinie waren in beiden Fällen auch vergleichbar. Darüber hinaus konnte spezifische Proliferation nach Restimulation mit passiv E7WT-RNA beladenen DC bei Donor B672 gefunden werden. Die T-Zelllinien, die im CFSE-Proliferationsassay sowohl mit passiv beladenen als auch mit ausgereift transfizierten getestet wurden, verhielten sich in beiden Fällen vergleichbar. Die CD4⁺ des Donors B678 proliferierten nach Restimulation mit passiv HPV16E7SH RNA beladenen DC, nicht aber mit ausgereift transfizierten.

Tab. 3.3.6: INF- γ ELISpot der HPV16E7 peptidspezifischen T-Zelllinien, Restimulation mit passiv CAP-RNA beladenen DC

Donor	restimuliert mit	Co ¹	spezif ²	p% ³	Frequenz ⁴
B671	E7WT-RNA	186±5	196±22	0,6	-
	E7SH-RNA	186±5	198±5	0,07	-
B672	E7WT-RNA	68±11	117±16	0,02	0,29
	E7SH-RNA	68±11	92±48	0,2	-
B676	E7WT-RNA	82±7	156±13	0,02	0,36
	E7SH-RNA	82±7	135±7	0,02	0,27
B678	E7WT-RNA	32±4	46±15	0,3	-
	E7SH-RNA	32±4	45±2	0,5	-

¹ Mittelwert \pm Standardabweichung, Spotzahl in der Kontrollreaktion nach Restimulation mit CAP-EGFP beladenen DC

² Mittelwert \pm Standardabweichung, Spotzahl nach Restimulation mit CAP-E7WT oder –SH RNA beladenen DC

³ Ergebnisse des Students t-Tests zur Bestimmung der Signifikanz des Unterschieds zwischen der Kontrollreaktion und der spezifischen Reaktion

⁴ Prozent spezifischer T-Zellen in der Kultur

Diese Daten lassen vermuten, dass passiv beladene DC ebenso gute Stimulatoren sind wie die mit der Amaxa-Technologie transfizierten. Dieses Experiment wurde allerdings nur einmal durchgeführt, so dass diese Aussage nicht bestätigt werden konnte. Da es Ziel dieser Arbeit war, die Amaxa-Transfektion zu etablieren, wurden diese Fragestellungen nicht weiter verfolgt. Auch in den noch folgenden Experimenten wurden die DC mit der Amaxa-Methode transfiziert.

Tab. 3.3.7: CFSE-Proliferationsassay der HPV16E7 peptidspezifischen T-Zelllinien, Restimulation mit passiv CAP-RNA beladenen DC

Donor	restimuliert mit		mean Co ¹	mean spezif ²	p% ³
B671	E7WT-RNA	CD4 ⁺	197±5	164±5	0,001
		CD8 ⁺	317±1	262±31	0,04
	E7SH-RNA	CD4 ⁺	197±5	166±1	0,0003
		CD8 ⁺	317±1	283±10	0,003
B676	E7WT-RNA	CD4 ⁺	258±8	220±15	0,02
		CD8 ⁺	432±16	373±5	0,004
	E7SH-RNA	CD4 ⁺	258±8	188±9	0,0005
		CD8 ⁺	432±16	334±23	0,01
B678	E7WT-RNA	CD4 ⁺	226±3	209±2	0,006
		CD8 ⁺	355±14	333±29	0,7
	E7SH-RNA	CD4 ⁺	226±3	197±11	0,03
		CD8 ⁺	355±14	300±14	0,2

¹ Mittelwert ± Standardabweichung aus Triplikaten, mittlere Fluoreszenz (mean all) der Kontrollreaktion mit passiv EGFP-RNA beladenen DC als Stimulatoren.

² Mittelwert ± Standardabweichung aus Triplikaten, mittlere Fluoreszenz (mean all) der spezifischen Reaktion mit passiv E7WT oder -SH-RNA beladenen DC.

³ Ergebnisse des Students t-Tests zur Bestimmung der Signifikanz des Unterschieds zwischen der Kontrollreaktion und der spezifischen Reaktion.

grau unterlegt wurden die als signifikant positiv bewerteten Reaktionen

3.3.3 Induktion von naiven T-Zellen mit CAP-E7WT und CAP-E7SH-RNA transfizierten DC

Im vorhergehenden Kapitel konnte gezeigt werden, dass eine HPV16E7 spezifische T-Zelllinie, die mit Peptiden generiert worden war, von dendritischen Zellen restimuliert werden konnten, die mit E7WT- oder E7SH-RNA mittels der Amaxa-Technologie transfiziert worden waren. Im nächsten Schritt sollte nun überprüft werden, ob die in der gleichen Weise mit RNA transfizierten dendritischen Zellen in naiven T-Zellen *de novo* eine Immunantwort gegen das transfizierte Antigen auslösen können. Das Vorgehen war dabei analog zu dem in Kapitel 3.2.5 beschriebenen.

3.3.3.1 Generierung von HPV16E7 spezifischen Zelllinien mit CAP-E7WT- und CAP-E7SH-RNA

Aus den *Buffy coats* von vier gesunden HLA-A2 positiven Donoren (B709, B711, B713 und B715) wurden T-Zellen und dendritische Zellen isoliert. Die T-Zellen wurden dreimal in wöchentlichen Abständen mit den durch Amaxa-Transfektion RNA beladenen autologen DC stimuliert. Pro Donor wurde eine Linie angelegt, die mit E7WT-RNA und eine die mit E7SH-RNA transfizierten DC stimuliert wurde. Nach der dritten Stimulation ruhten die T-Zellen für weitere drei Wochen, bevor sie in den immunologischen Assays eingesetzt wurden.

3.3.3.2 Phänotypisierung der RNA-induzierten T-Zelllinien

Nach Ende der Ruhephase wurden die generierten Linien phänotypisiert, d.h. es wurde durch direkte Fluoreszenzanfärbung der entsprechenden Oberflächenmoleküle der Anteil CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sowie der natürlichen Killerzellen (NK, CD56) und CD25 als Marker für aktivierte T-Zellen in den Linien bestimmt (Tab. 3.3.8).

Auffällig war, dass in allen acht T-Zelllinien der Anteil der CD8⁺ T-Zellen höher war als der Anteil der CD4⁺, wobei der Anteil zwischen über 85% und 52% offensichtlich donorabhängig variiert. Der Prozentsatz der aktivierten (CD25-positiven) T-Zellen lag in etwa zwischen 20% und 30%.

Tab. 3.3.8 Phänotypisierung der mit RNA transfizierten DC induzierten T-Zelllinien

	angefärbtes Oberflächenmolekül %					
	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD25 ⁺	CD4 ⁺ /25	CD8 ⁺ /25 ⁺	CD56 ⁺
B709 WT	26,78	85,9	17,3	22,29	25,29	3,46
B709 SH	26,75	84,9	23,1	16,27	28,3	14
B711 WT	42,34	52,2	27,3	28,14	22,65	7,87
B711 SH	45,7	52,2	32,8	31,66	21,65	6,28
B713 WT	47,3	79,3	10,23	36,21	11,29	5,27
B713 SH	25,3	77,94	34,1	35,65	14,65	2,42
B715 WT	35,34	67,01	21,1	25,66	12,98	12,8
B715 SH	38,4	72,94	27	26,07	12,61	0,86

3.3.3.3 Spezifische Proliferation der mit RNA transfizierten DC induzierten T-Zelllinien

Im ^3H -Proliferationsassay wurden ausschließlich CD4^+ T-Zellen eingesetzt, die durch eine CD8^+ positiv-Selektion gewonnen wurden. Die Reinheit der CD4^+ T-Zellen nach der Separation war durch direkte Fluoreszenzanfärbung des CD4 -Rezeptors überprüft worden und lag bei über 95%. Pro Loch wurden 1×10^5 CD4^+ T-Zellen und 1×10^4 DC als Stimulatoren eingesetzt. Es wurde auf das Vorhandensein einer spezifischen Reaktion gegen den 35mer Peptidpool getestet. Für die Kontrollreaktion wurden mit Humanalbumin beladene DC eingesetzt. Der Assay wurde am dritten Tag durch Zugabe von ^3H -Thymidin gepulst und nach weiteren 18 h wurde der ^3H -Thymidin-Einbau durch Einfrieren der Zellen abgestoppt. Die Messung des ^3H -Thymidineinbaus erfolgte mit einem Szintillationszähler. Im ^3H -Proliferationsassay konnten keine spezifisch proliferierenden CD4^+ T-Zellen in den RNA-induzierten Linien gefunden werden. Ein CFSE-Proliferationsassay, der dieses Ergebnis gegebenenfalls hätte untermauern können, war nicht auswertbar.

Tab. 3.3.9 ^3H -Proliferationsassay der CD4^+ der RNA-induzierten T-Zelllinien nach Restimulation mit 35mer Peptiden.

Linie	Restimulation mit HPV16E7 35mer Pool		
	Co ¹	spez ²	p % ³
B709 WT	8573±106	9840±2076	0,5
B709 SH	7866±2115	8760±1609	0,7
B711 WT	7537±1003	7800±2777	0,8
B711 SH	10433±557	9779±824	-
B713 WT	16805±1560	18403±1576	0,4
B713 SH	19091±512	19265±130	0,7
B715 WT	9865±2514	10970±1157	0,8
B715 SH	24613±17239	13608±1126	-

¹ Mittelwert ± Standardabweichung aus Triplikaten, *Counts per minute* der Kontrollreaktion nach Restimulation mit humanalbuminbeladenen DC

² Mittelwert ± Standardabweichung aus Triplikaten, *Counts per minute* der spezifischen Reaktion nach Restimulation mit E7 peptidpoolbeladenen DC

³ Ergebnisse des Students t-Tests zur Bestimmung der Signifikanz des Unterschieds zwischen der Kontrollreaktion und der spezifischen Reaktion

3.3.3.4 Spezifische INF- γ Sekretion der RNA-induzierten T-Zelllinien

Im ELISpot wurden die positiv selektierten CD8⁺ T-Zellen eingesetzt. Die Reinheit der CD8⁺ Kulturen wurde vor der Durchführung des Assays überprüft und lag in allen Fällen über 95%. Pro Im INF- γ ELISpot wurde die Reaktion gegen den HPV16E7 35mer Peptidpool, aber auch die Reaktion gegen die drei bekannten HLA-A2 restringierten CTL-Epitope E7₁₁₋₂₀, E7₈₂₋₉₀ und E7₈₆₋₉₃ getestet. Als Negativkontrolle für den Peptidpool wurde Humanalbumin eingesetzt. Das Kontrollpeptid für die CTL-Epitope war HPV16E6₂₉₋₃₆.

Im ELISpot konnten 4/4 T-Zelllinien, die mit E7WT-RNA generiert wurden durch mit E7-Peptidpool beladene DC restimuliert werden (Tab. 3.3.10). Von den mit E7SH generierten T-Zelllinien reagieren drei von vier mit spezifischer INF- γ Sekretion auf die Restimulation mit dem Wildtyppeptid. Die Reaktion der Linie B711SH kann aber, wie es scheint, nur aufgrund der sehr hohen Standardabweichungen nicht als signifikant positiv eingestuft werden. Somit kann anhand dieses Ergebnisses festgestellt werden, dass mit der Amaxa-Technologie RNA-transfizierte dendritische Zellen in der Lage sind, eine CD8⁺Immunantwort in naiven T-Zellen zu induzieren.

Tab. 3.3.10 Spezifische INF- γ Sekretion der RNA-induzierten T-Zelllinien nach Restimulation mit dem HPV16E7 35mer Peptidpool

A	Co¹	E7 35mer²	p %³	Frequenz %⁴
B709 WT	88±7	131±15	0,01	0,22
B709 SH	87±12	162±25	0,07	0,38
B711 WT	89±1	112±1	0,008	0,11
B711 SH	57±39	110±76	0,6	-
B713 WT	112±6	142±15	0,04	0,15
B713 SH	63±1	101±10	0,003	0,19
B715 WT	113±7	161±11	0,003	0,24
B715 SH	41±14	206±16	0,002	0,47

¹ Mittelwert ± Standardabweichung, Spotzahl in der Kontrollreaktion nach Restimulation mit humanalbuminbeladenen DC

² Mittelwert ± Standardabweichung, Spotzahl nach Restimulation mit E7 35mer Peptidpool beladenen DC

³ Ergebnisse des Students t-Tests zur Bestimmung der Signifikanz des Unterschieds zwischen der Kontrollreaktion und der spezifischen Reaktion

⁴ Prozent spezifischer CTL in der Kultur

die als signifikant positiv bewerteten Reaktionen wurden grau unterlegt

In Kapitel 3.2.5 (zu Tab. 3.2.9) war festgestellt worden, dass mit pTHamp-HPV16E7SH generierte T-Zelllinien höhere Frequenzen an spezifischen CTL erreicht wurden, als in den pTHamp-HPV16E7WT generierten Linien desselben Donors. Diese Beobachtung kann auch hier gemacht werden. Bei den drei Donoren, bei denen beide Linien signifikant

positiv reagieren, ist die Frequenz der spezifischen CTL in den mit E7SH-RNA generierten Linien höher. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Immunogenität des geschuffelten Genes höher ist als die des Wildtypgens. Insgesamt wurden acht T-Zelllinien getestet. Zwei Linien reagierten auf keines der drei Epitope. Die übrigen sechs Linien enthielten spezifische T-Zellen, die gegen das Epitop E7₁₁₋₂₀ gerichtet waren. Die beiden Linien des Donors B709 enthielten zusätzlich CTL, die auf das Epitop E7₈₂₋₉₀ spezifisch reagierten. Gegen E7₈₆₋₉₃ reagierte keine dieser Linien. Damit konnte bestätigt werden, dass das Epitop E7₁₁₋₂₀ immundominant ist.

Tab. 3.3.11 Spezifische INF- γ Sekretion der RNA-induzierten T-Zelllinien nach Restimulation mit den HPV16E7 HLA-A2 restringierten CTL-Epitopen

B		Co ¹	E7 11-20 ²	p % ³	Fr % ⁴	E7 82-90 ²	p% ³	Fr % ⁴	E7 86-93 ²	p % ³	Fr % ⁴
B709	WT	85±17	144±9	0,003	0,3	154±29	0,03	0,3 5	92±28	0,06	-
	SH	91±15	182±21	0,01	0,4 5	151±16	0,01	0,3	154±9	-	-
B711	WT	88±11	92±17	0,9	-	88±18	0,9	-	97±53	0,8	-
	SH	69±15	90±2	0,004	0,1 1	57±23	-	-	51±22	-	-
B713	WT	130±10	164±2	0,002	0,1 7	149±27	0,6	-	110±31	0,3	-
	SH	62±13	74±29	0,8	-	61±8	0,3	-	37±6	-	-
B715	WT	108±5	149±7	0,02	0,2 1	93±16	-	-	108±22	0,9	-
	SH	93±	187±4	0,000 7	0,2 3	144±10	-	-	191±53	0,9	-

¹ Mittelwert \pm Standardabweichung aus Triplikaten, Anzahl der Spots der Kontrollreaktion nach Restimulation mit E6₂₉₋₃₆ beladenen DC

² Mittelwert \pm Standardabweichung aus Triplikaten, Anzahl der Spots der spezifischen Reaktion nach Restimulation mit E7 9mer Epitopen beladenen DC

³ Ergebnisse des Students t-Tests zur Bestimmung der Signifikanz des Unterschieds zwischen der Kontrollreaktion und der spezifischen Reaktion

⁴ Prozent spezifischer CTL in der Kultur

Die als signifikant positiv bewerteten Reaktionen wurden grau unterlegt

3.4 Restimulation von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) aus HPV16-positiven Tumoren mit pTHamp-HPV16E7SH und E7SH-RNA transfizierten DC

Als abschließenden Beweis dafür, dass die in dieser Arbeit etablierte Methode zur Transfektion von dendritischen Zellen tatsächlich potente Stimulatoren für T-Zellen erzeugt, wurde ein INF- γ ELISpot mit Patientenmaterial durchgeführt.

Aus einer Sammlung isolierter TIL wurde Zellmaterial von fünf Patientinnen ausgewählt, deren Zervixkarzinom positiv auf HPV16 getestet worden war. Für das Experiment wurden die aus Tumormaterial gewonnenen TIL und die aus dem Blut isolierten autologen dendritischen Zellen benötigt. Die TIL wurden nach dem Auftauen in konditionierten AIM-V

Medium kultiviert und zwei Wochen mit CD3/CD28 Beads expandiert. Nach weiteren drei Wochen Ruhephase wurden die TIL im ELISpot getestet. Da sehr wenige Zellen zur Verfügung standen, wurde auf eine CD8-Selektion verzichtet. Es wurde getestet, ob die TIL mit spezifischer INF- γ Sekretion auf die Restimulation mit pTHamp-HPV16E7SH und E7SH-RNA reagierten. Als Positivkontrolle wurde die Reaktion auf den 35mer Peptidpool getestet.

Tab. 3.4.1 spezifische INF- γ Sekretion von TIL nach Restimulation mit 35mer peptidbeladenen DC

	restimuliert mit E7 35mer Peptiden			
	Co ¹	spezif. ²	p % ³	Fr ⁴
Pt 69	2 \pm 3	14 \pm 14	0,2	-
Pt 112	4 \pm 4	5 \pm 4	0,8	-
Pt 124	3 \pm 3	2 \pm 2	-	-
Pt 217	6 \pm 3	30 \pm 2	0,0004	0,12
Pt 219	2 \pm 2	3 \pm 2	0,5	-

¹ Mittelwert \pm Standardabweichung aus Triplikaten, Spotzahl in der Kontrollreaktion nach Restimulation mit humanalbuminbeladenen DC

² Mittelwert \pm Standardabweichung aus Triplikaten, Spotzahl nach Restimulation mit E7 35mer Peptidpool beladenen DC

³ Ergebnisse des Students t-Tests zur Bestimmung der Signifikanz des Unterschieds zwischen der Kontrollreaktion und der spezifischen Reaktion

⁴ Prozent spezifischer CTL in der Kultur.

Pro Loch wurden 2×10^4 TIL und 2×10^3 DC eingesetzt.

Die als signifikant positiv bewerteten Reaktionen wurden grau unterlegt.

Die Spotzahlen in diesem Assay waren sehr gering. Das lag daran, dass sehr geringe Zellzahlen für den Assay eingesetzt werden mussten. Da eine Phänotypisierung aus Mangel an TIL nicht möglich war, war die Anzahl der eingesetzten CD8⁺ nicht bekannt. Die statistische Auswertung mit dem Students t-Test zeigt, dass die TIL der Patientin Pt 217 signifikant positiv auf E7 35mer Peptidpool beladene DC reagierten. Es waren nicht von allen Patientinnen genug TIL vorhanden, um die Reaktion auf DNA und RNA zu testen. Insgesamt reagieren 3/4 Patientinnen signifikant positiv auf die Restimulation mit pTHamp-HPV16E7SH und die TIL einer Patientin auf die Restimulation mit E7SH-RNA. Die TILs der Patientin 217 reagierten mit spezifischer INF- γ Sekretion auf die Restimulation mit Peptid, DNA und RNA. Mit diesen Ergebnissen konnte bewiesen werden, dass die DC, die mit der Amaxa-Technologie in ausgereiftem Zustand mit DNA oder RNA transfiziert wurden, geeignet sind, spezifische T-Zellen zu stimulieren.

Tab. 3.4.2 spezifische INF- γ Sekretion der TILS nach Restimulation mit pTHamp-HPV16E7SH und E7SH-RNA transfizierten DC

	restimuliert mit pTHamp-HPV16E7SH				restimuliert mit E7SH RNA			
	Co ¹	spezif. ²	p % ³	Fr ⁴	Co ¹	spezif. ²	p % ³	Fr ⁴
Pt 69	6 \pm 0	16 \pm 4	0,04	0,05	3 \pm 1	11 \pm 7	0,4	-
Pt 112	2 \pm 1	12 \pm 2	0,0004	0,05	n.d.	n.d.	-	-
Pt 124	4 \pm 1	8 \pm 12	0,2	-	8 \pm 3	3 \pm 4	-	-
Pt 217	6 \pm 1	18 \pm 3	0,004	0,06	4 \pm 3	24 \pm 2	0,0006	0,1
Pt 219	n.d.	n.d.	-	-	3 \pm 3	10 \pm 5	0,1	-

¹ Mittelwert \pm Standardabweichung, Spotzahl in der Kontrollreaktion nach Restimulation mit pCMV-EGFP oder EGFP-RNA transfizierten DC

² Mittelwert \pm Standardabweichung, Spotzahl nach Restimulation mit pTHamp-HPV16E7SH oder E7SH-RNA transfizierten DC

³ Ergebnisse des Students t-Tests zur Bestimmung der Signifikanz des Unterschieds zwischen der Kontrollreaktion und der spezifischen Reaktion

⁴ Prozent spezifischer CTL in der Kultur

Die als signifikant positiv bewerteten Reaktionen wurden grau unterlegt

In Abschnitt 3.1.8 waren die Seren der Patientinnen, deren Zellmaterial hier bearbeitet wurde, im Talon ELISA vermessen worden. Das Serum von Pt 124 hatte eine positive Reaktion mit HPV16E7-Protein gezeigt. Für die TIL dieser Patientin konnte weder im Proliferationsassay noch im ELISpot eine spezifische Reaktion ermittelt werden. Das Serum von Pt 217, deren TIL durchgehend in den immunologischen Assays spezifisch reagierten wurde als negativ eingestuft (Tab. 3.1.3).

4. Diskussion

4.1. Talon ELISA

Nach einer Infektion mit einem der etwa 100 verschiedenen den Menschen infizierenden Papillomviren und bei einer HPV-induzierten Erkrankung wie z. B. dem Zervixkarzinom werden typenspezifische Antikörper gebildet (Dillner, 1999). Da es kaum Kreuzreaktionen gibt, wird die HPV-Serologie relativ komplex. Die gängige Methode des Antikörpernachweises ist der ELISA. Dieser erfordert ein hohes Maß an Optimierungsarbeit für jeden einzelnen Antikörpernachweis. Mit der als Talon ELISA benannten Methode ist es möglich, schnell, einfach und mit einer guten Sensitivität Antikörper in Seren nachzuweisen. Die Antikörperbindung erfolgt an magnetische Partikel, die das His-getaggte Antigen auf der Oberfläche tragen. Zur Messung der Antikörperbindung wird ein Durchflusszytometer eingesetzt, dass in immunologischen Laboren üblicherweise vorhanden ist. Diese Methode wurde anhand von drei Antigenen und einer Sammlung von 100 bereits definierten Seren entwickelt und validiert. Zeitgleich mit dieser Arbeit wurde von Waterboer et al. (2005) eine Multiplexmethode entwickelt, die eine hohe Automatisierung und die parallele Messung mehrerer Antikörper erlaubt. Diese Methode benötigt allerdings eine spezielle technische Ausrüstung (Luminex-Technologie), die in vielen Laboren, deren Focus nicht auf der Serologie liegt, fehlt. Daher schien es wünschenswert, eine Methode zu entwickeln, die weniger kosten- und entwicklungsintensiv ist, als ein ELISA, aber in jedem immunologischen Labor mit Hilfe der Standardausrüstung durchgeführt werden kann.

4.1.1 Etablierung der Messbedingungen

Der Talon ELISA basiert auf der Möglichkeit Proteine, die mit einem Histidintag versehen sind an paramagnetische Partikel der Firma Dynal (Oslo, Norwegen), den sogenannten „Talon Beads“ spezifisch zu binden. Diese als Antigen fungierenden Proteine dienten als Bindungsstellen für spezifische Antikörper. Die Antigen-Antikörperbindung konnte mittels fluoreszenzmarkierten, gegen den Antikörper gerichteten Zweitantikörpern nachgewiesen werden. Die Messung erfolgte am FACSCalibur. Als Maß für die Antigen-Antikörperreaktion wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) genutzt. Die Bewertung der Sensitivität und der Spezifität des Talon ELISA ist in Kapitel 4.2.1 besprochen.

Nach der Entwicklung der Idee zu dieser Methode, die schematisch in Abbildung 3.2.1 dargestellt wurde, war es zunächst notwendig, die Parameter zu finden, die ihre Durchführung ermöglichten.

Basis für die reproduzierbare Messung der Signale war eine vollständige Absättigung der paramagnetischen Talon-Beads mit dem Antigen. Hierzu wurde eine Reihe von Experimenten durchgeführt, die in den Abschnitten 3.1.3 und 3.1.4 gezeigt werden. Als nachteilig für diese Methode kann gewertet werden, dass keine Möglichkeit gefunden wurde, natives Antigen effizient an die Beads zu binden. Durch die daraus resultierende Entscheidung, das Antigen in denaturiertem Zustand an die Beads zu binden, wurde ein gewisser Sensitivitätsverlust des Antikörpernachweises in Kauf genommen. In denaturiertem Zustand können Antikörper nicht erfasst werden, die konformationsabhängige Epitope erkennen. Als großer Vorteil dieser Methode ist zu werten, dass es möglich ist, die Beads aus einem Gesamtbakterienlysat mit rekombinant exprimierten Protein zu beladen. Hierdurch entfällt der arbeitsintensive Prozess der Proteinaufreinigung. Eine Serumsverdünnung von 1:100 führt zu einem relativ geringen Bedarf an Patientenmaterial (Abschn. 3.1.6). Durch den Einsatz eines zweistufigen sekundären Nachweissystems (Biotin/Streptavidin-RPE) konnte bei einer Serumverdünnung von 1:100 eine große Steigerung der Sensitivität erreicht werden (Abb. 3.1.16). Die Entwicklung der Beladungs- und Messmethodik wurde anhand von zwei Antigenen erreicht, HPV16E7 und HPV16E7SH. Die Anpassung an andere Antigene kann mit wenigen Optimierungsschritten zur Proteinbeladung der Talon-Beads vollzogen werden.

4.1.2 Statistik und Vergleich des Talon ELISA basierend auf der Luminex-Methode nach Waterboer et al. (2005)

Zur statistischen Beurteilung der Sensitivität und der Spezifität des Talon ELISA wurden 100 Seren, die bereits mit der Luminex-Methode vermessen wurden, eingesetzt. Als Antigene wurden HPV16E7, HPV16E7SH und HPV18E7 verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte über eine Interassay-Korrelation, die die Beurteilung der Reproduzierbarkeit der Daten möglich macht und eine κ -Analyse, die zum Vergleich der Sensitivität des Talon ELISA im Vergleich zur Luminex-Methode nach Waterboer et al. (2005) herangezogen wurde. Aus den Ergebnissen der Interassay-Korrelation (Abb. 3.1.17) wurde eine sehr gute Korrelation zwischen den an verschiedenen Tagen unabhängig voneinander durchgeführten Antikörpernachweisen für die Proteine HPV16E7 ($R^2=0.95$) und -E7SH ($R^2=0.90$) gefunden. Für das Protein HPV18E7 konnte die Korrelation ($R^2=0.6$) als gut bewertet werden. Der Talon ELISA kann somit als eine für die hier eingesetzten Antigene als gut reproduzierbare Methode bezeichnet werden.

In der κ -Analyse (Abb. 3.1.18) zeigte sich, dass der Talon ELISA für die getesteten Antigene durchaus gut übereinstimmt mit der Luminex-Serologie (Vgl. κ -Werte in Abb.3.1.18). Allerdings geht daraus hervor, dass die Sensitivität des Talon ELISA nicht

gleichzusetzen ist mit der der Luminex-Methode. Schwach positive Seren können nicht als solche erfasst werden. Allerdings sind schwach reagierende Seren wahrscheinlich auch von geringerer Relevanz.

4.1.3 Beurteilung des Talon ELISA und Ausblick auf das Potential der Methode

Die hier entwickelte Methode des Talon ELISA ist sicher keine Alternative für serologische Labore, die mit einem hohen Probendurchsatz eine große Breite an Antikörpern nachweisen wollen. In diesen Bereichen ist die von Waterboer et al. publizierte Methode viel weiter entwickelt. Der Talon ELISA ist aber sicher eine wenig kostspielige Methode, die es erlaubt, schnell ein Nachweissystem für Antikörper zu erhalten, sofern die durch sie erkannten Antigene rekombinant als His-getaggt Protein exprimierbar sind. Das ist z.B. interessant, wenn es um Verlaufskontrollen von Vakzinierungstudien geht. Der Talon ELISA bietet noch einiges Entwicklungspotential. So ist eine parallele Messung von Antikörperisotypen durch die Verwendung unterschiedlich fluoreszenzmarkierter isotypenspezifischer Sekundärantikörper denkbar. Ein weiteres Einsatzgebiet wäre das systematische *Screenen* von potentiellen Antikörpern oder Hybridomen zu Forschungszwecken.

4.2. Optimierung der Nukleofektion von DC und *in vitro* Untersuchungen zur T-Zellimmunogenität der HPV16E7SH-Vakzine

4.2.1. Optimierung der Transfektion

Zur Durchführung von *in vitro* Analysen zur Beurteilung der Immunogenität der HPV16E7SH Vakzine im humanen System war es notwendig, über eine Technik zu verfügen, die es ermöglichte, DNA und mRNA in DC einzubringen, ohne ihre Wirksamkeit als APC zu beeinträchtigen. Es gibt verschiedene Methoden, Nukleinsäuren in Zellen zu transfizieren. Einige Arbeitsgruppen verwenden virale Vektorsysteme (Dietz, et al., 1998; Brossart et al, 1998). Mit dieser Methode können hohe Transduktionseffizienzen erreicht werden. Sie ist aber hinsichtlich der biologischen Sicherheit nicht unbedenklich und deshalb in der klinischen Anwendung begrenzt einsetzbar. Virale Vektoren können die biologischen Funktionen der DC negativ beeinflussen (Engelmeyer et al., 1999; Jonuleit et al., 2000). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass immundominante Vektorepitope die Immunantwort gegen das eigentliche Antigen unterdrücken können (Yewdell et al., 1999; Palmowsky et al., 2002). Nichtvirale Transfektionssysteme wie etwa der lipidvermittelte Transfer werden auch eingesetzt (Ashley et al., 1997; Nair et al., 2000; Kobayashi et al., 2003). Sie führen aber, besonders bei den schwer transfizierbaren DC zu sehr schlechten Transfektionsraten (Strobel et al., 2000; Lohmann et al., 2000; Van Tendeloo et al., 1998;

2001) und zu schlechter Viabilität der Zellen. Auch in dieser Arbeit ist die DOTAP-vermittelte Transfektion mit ungünstigem Ergebnis getestet worden (Abschnitt 3.3.1.1, Abb. 3.3.1). Für das einbringen von mRNA in DC beschreibt die Arbeitsgruppe um Gilboa auch Erfolge mit der so genannten passiven Beladung (Nair et al., 1998, 2000; Heiser et al., 1998, 2001a und b; Su et al., 2003, siehe auch Abschn. 4.2.5). Die zurzeit gebräuchlichste Methode der Transfektion von DC ist allerdings die Elektroporation (Van Tendeloo et al., 2001), da diese Methode auch geeignet ist, DC für die klinische Anwendung zu transfizieren. In der Literatur wurden allerdings nur für die Elektroporation von mRNA sehr gute Transfektionseffizienzen beschrieben, während die DNA-Transfektion weniger gute Ergebnisse erzielt, vor allem wenn aus Monozytenvorläuferzellen gewonnene DC eingesetzt werden (van Tendeloo et al., 2001). Die Nukleofektion ist eine Variante der Elektroporation, bei der die Nukleinsäuren direkt in den Zellkern transportiert werden. Damit ist sie besonders interessant für das Einbringen von DNA in sich nicht teilende Zellen. Diese Zellen sind mit der „klassischen“ Elektroporationsmethode bei der die Nukleinsäuren ins Cytoplasma gelangen nicht effizient transfizierbar, da in ihnen nur wenig DNA-Austausch zwischen Zytosol und dem Zellkern stattfindet, dem Ort der Transkription. Die Firma Amaxa (Köln) hat einen speziell für die Transfektion von dendritischen Zellen geeigneten Kit und das dazugehörige Nukleofektionsgerät mit voreingestellten Transfektionsprogrammen entwickelt. Der Hersteller gibt an, dass mit dieser Methode auch für die Transfektion mit DNA Transfektionsraten von etwa 50% erreicht werden können. Dieses System wird als eine Art *black box* vertrieben, so dass die Zusammensetzung der einzusetzenden Lösungen oder Transfektionsbedingungen nicht bekannt sind. Die ersten Veröffentlichung zur Verwendung des neu entwickelten *Dendritic Cell Nucleofector Kit* waren Lenz et al., 2003 und Martinet et al., 2003. Martinet und Kollegen legen vor allem Wert darauf, den Vorteil der Nukleofektion für die Transfektion von DNA in humane Monozyten im Verhältnis zur „klassischen“ Transfektion zu beschreiben. Lenz et al. dagegen arbeiteten mit humanen DC. In der vorliegenden Arbeit wurde die Transfektion der DC mit DNA mit Hilfe eines EGFP-exprimierenden Vektors optimiert (Abschnitt 3.2.1). In ersten Experimenten zur Transfektionsoptimierung (Abb.3.2.1) zeigte sich, dass mit dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll keine effiziente Transfektion möglich war. Nach Rücksprache mit dem Hersteller konnte allerdings ein Protokoll erarbeitet werden, dass Transfektionsraten von 30-70% ermöglichte. Es wurde, anstelle des vom Hersteller empfohlenen Programms U-2, das Programm U-7 als das geeignetste identifiziert. Die strikter gewählten Transfektionsbedingungen (Angaben des Herstellers) führten zu einer schlechteren Viabilität der Zellen (74% überlebende Zellen anstelle von 89%), die aber akzeptabel war. Durch Konzentrationsvariationen wurde die optimale DNA-Menge bestimmt sowie der

Einfluss der Zelldichte auf die Transfektionseffizienz und die Viabilität der Zellen untersucht. Die Transfektion der DC mit RNA (Abschnitt 3.3.1) wurde anhand der Erfahrungen etabliert, die mit der DNA-Transfektion gewonnen worden waren. Die bei der Transfektion erreichten Effizienzen lagen hierbei etwas niedriger (ca. 30%) als die bei der Transfektion von DNA erreichten. Obwohl nach den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten das Optimierungspotential für die Nukleofektion von DC mit RNA noch nicht völlig ausgeschöpft ist, kann man vermuten, dass diese Methode besser zum Einbringen von DNA in DC geeignet ist als für mRNA. Die DNA befindet sich im Kern am Ort der Transkription, während die mRNA zur Translation erst ins Zytoplasma transportiert werden muss.

4.2.2 Transfektion von ausgereiften DC

Im Verlaufe der Experimente zur Optimierung der Transfektionsmethode wurde der Reifezustand der DC routinemäßig überprüft. Hierfür wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD83, des Costimulus CD86 und von MHCII anhand direkter Fluoreszenzanfärbung und FACS-Analyse gemessen. Es stellte sich heraus, dass die für die effiziente Aktivierung von T-Zellen notwendige Hochregulation dieser Oberflächenproteine nach Stimulation zur terminalen Ausreifung nicht stattfand (Vgl. Abb. 3.2.11). Die transfizierten DC zeigten sowohl nach 24 h wie auch nach 48 h terminaler Ausreifung mit Zytokincocktail keinen reifen Phänotyp. Auch durch die Verwendung anderer Reifestimuli wie LPS konnte keine Ausreifung der DC erreicht werden, wie die Abbildung 3.2.9 und die Tabelle 3.2.1 zeigen. Diese Beobachtung wurde durch die Arbeiten von Lenz et al. (2003) bestätigt, die bei der Verwendung der Amaxa-Methode zur DNA-Transfektion ebenfalls feststellten, dass unreife DC nach der Transfektion keine Hochregulation der Marker CD83, CD80 und CD40 zeigten, wenn sie für 24 h mit LPS behandelt wurden. Um die sehr effiziente Amaxa-Transfektionsmethode, für die es zur DNA-Transfektion keine gleichwertige Alternative gibt, trotzdem nutzen zu können, wurde untersucht, ob es möglich wäre, bereits ausgereifte DC zu transfizieren. Es konnte gezeigt werden, dass ausgereifte DC mit vergleichbarer Effizienz und Viabilität transfizierbar waren (Abb. 3.2.10). Sie behalten nach der Transfektion ihren reifen Phänotyp (Abb. 3.2.11). Beide Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen der Arbeit von Michiels et al. (2005), die erst nach Ende der experimentellen Phase dieser Arbeit erschien. Diese Arbeitsgruppe verglich die „klassische“ Transfektion mit mRNA in ausgereiften und unreifen DC. Bis dahin waren in allen veröffentlichten Arbeiten nur unreif transfizierte DC verwendet worden, da die Arbeit von van Tendeloo et al. (2001) beschreibt, dass unreif transfizierte DC, die erst anschließend den terminalen Reifestimulus erhalten, die besten APC darstellen. Allerdings hatte diese Arbeitsgruppe mit TNF- α und LPS als

Reifungsreagenz gearbeitet. Die Verwendung dieser Reifungsstimuli führt aber insgesamt zu einem geringeren Prozentsatz an DC, die einen vollständig ausgereiften Phänotyp aufweisen als die Verwendung des Zytokincocktails nach Jonuleit, et al. (1997), der in dieser Arbeit und auch von Michiels et al. verwendet wurde. Dies könnte ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. Auch die Arbeitsgruppe um Schuler veröffentlichte 2005 eine Untersuchung zur Transfektion von bereits ausgereiften DC (Schaft et al., 2005). Sie zeigten, dass die Elektroporation von ausgereiften DC mit mRNA effektivere APC erzeugt. Es muss allerdings erwähnt werden, dass in Schafsts Arbeit mit der Elektroporation, die die Nukleinsäuren ins Zytoplasma einbringt, eine andere Transfektionsmethode als die in der vorliegenden Arbeit verwendete Nukleofektion zum Einsatz kam. Die Elektroporation ist für das Einbringen von DNA in DC, wie bereits diskutiert, nicht geeignet und sie inhibiert im Gegensatz zur Nukleofektion nicht die terminale Differenzierung von DC.

4.2.3. Untersuchung des T-Zell-Stimulationspotentials von ausgereift transfizierten DC

Zum funktionellen Vergleich der Kapazität zur T-Zellinduktion von unreif und ausgereift transfizierten DC wurden diese als Stimulatoren in einer Allo-MLR eingesetzt (Abb. 3.2.13). Die ausgereift transfizierten DC zeigten hochsignifikant ein höheres Potential allogene T-Zellen zur Proliferation zu stimulieren. Die IL-12 Produktion durch reife antigenpräsentierende DC ist ein wichtiger Faktor bei der Induktion der T_H1 -Antwort und damit auch der Induktion der zellulären Immunantwort. Der in Abb. 3.2.12 dargestellte IL-12 ELISA, durchgeführt an den Kulturüberständen der in unterschiedlichen Reifungszuständen transfizierten DC, sollte Hinweise darauf geben, ob es Unterschiede in der IL-12 Produktion gibt. Das Ergebnis dieses Experiments ist erstaunlich. Unreife bzw. unreif transfizierte DC produzieren kaum nachweisbare Mengen an IL-12. Während untransfiziert ausgereifte DC IL-12 Konzentrationen produzieren, die nur geringfügig und nicht signifikant höher sind, als bei unreifen DC, produzierten die ausgereift transfizierten DC 50 mal mehr IL-12. Dieses Ergebnis war reproduzierbar. Möglicherweise erfolgt durch die Transfektion der ausgereiften DC ein Stimulus, der die IL-12 Produktion der DC erhöht. Welcher Art dieser Stimulus sein könnte, ist nicht bekannt. Die höhere IL-12 Produktion ist ein wichtiger Hinweis für das gute T-Zell-Aktivierungspotential der ausgereift transfizierten DC. Spizek et al. (2001) untersuchten systematisch den Effekt verschiedener Stimuli auf die Reifung von DC. Sie konnten bestätigen, dass der Zytokincocktail (Jonuleit et al., 1997) den besten Stimulus zur Produktion von DC mit vollständig reifem Phänotyp darstellt. Sie zeigten weiterhin, dass die Produktion von hohen Mengen an IL-12 p70 durch DC erst nach der Rückstimulation durch aktivierte T-

Zellen beginnt. Ausschließlich bei Ausreifung der DC durch Zugabe von doppelsträngiger RNA (Poly I:C) produzieren die DC das biologisch aktive IL-12 p70 unabhängig von der Rückstimulation durch aktivierte T-Zellen in hohen Mengen. Die Autoren sehen in der Verwendung von doppelsträngiger RNA als Reifungsstimulus eine Möglichkeit zur Modulation der Immunantwort in Richtung der für die Immuntherapie gewünschten Th1-Antwort.

4.2.4 Spezifische funktionelle Aktivität von reif und unreif transfizierten DC als APC in immunologischen Assays-Restimulationsexperimente

Anhand der DNA-Vakzine pTHamp-HPV16E7SH und dem Kontrollkonstrukt pTHamp-HPV16E7WT sollte der funktionelle Nachweis erbracht werden, dass die Nukleofektion von reifen DC mit DNA und auch mRNA eine geeignete Methode ist, effizient potente APC zu erzeugen. In Kapitel 3.2.2 wurde auf RNA- und Proteinebene gezeigt, dass diese Konstrukte in den transfizierten DC transkribiert und auch translatiert werden.

Mit Hilfe von peptidinduzierten HPV16E7 spezifischen T-Zelllinien wurde untersucht, ob unreif oder ausgereift mit der DNA und mRNA dieses Antigens transfizierte DC spezifische Immunantworten restimulieren können. Der INF- γ ELISpot, der als sensitivste Methode zum Nachweis spezifischer CTL gilt (Michel et al., 2002) und der CFSE-Proliferationsassay, der die getrennte Betrachtung der CD4⁺- und der CD8⁺-T-Zellantwort ermöglicht, wurden als Assays ausgewählt.

Im ELISpot waren 4/4 getesteten T-Zelllinien positiv in der Kontrollreaktion gegen peptidgepulste DC, 3/4 Linien reagierten nach Restimulation mit reif transfizierten DC spezifisch. Wurden jedoch unreif transfizierte DC als Stimulatoren eingesetzt, konnte im INF- γ ELISpot keine spezifische Reaktion gefunden werden (Tab. 3.2.2). Der Proliferationsassay (Tab. 3.2.3) zeigte ähnliche Ergebnisse. Die äquivalenten Experimente mit E7SH- und E7WT- mRNA zeigten gleiche Tendenzen (Tab. 3.3.2 bis 3.3.5). Mit dieser Gruppe von Experimenten konnte bewiesen werden, dass die vor der Transfektion ausgereiften DC erheblich besser zur Antigenpräsentation und zur Restimulation von T-Zellen geeignet sind. Die geringe Oberflächenexpression der costimulatorischen Moleküle an der Zelloberfläche von unreif transfizierten DC, die ja nahezu dem unreifen Zustand entspricht, ermöglicht es ihnen nicht, effektiv T-Zellen zu restimulieren. Die „klassische“ Elektroporationsmethode mittels Genepulser, die in den Arbeiten von Schaft et al. (2005) und Michiel et al. (2005) zur Transfektion von RNA eingesetzt wurde, hat das bei der Nukleofektion nach der Amaxa-Methode auftretende Problem der fehlenden terminalen Ausreifung von unreif transfizierten DC nicht. Mit dieser Methode transfizierte DC haben keine Hemmung in der Ausbildung eines reifen Phänotyps, wie es bei der Amaxa-Methode der Fall ist. Michiels et al. (2005) erzielten durch die Transfektion von bereits

ausgereiften DC eine in Bezug auf viele Reifungsmarker und costimulatorische Signale (CD80, CD83, CD40) signifikante, aber nur geringe Verbesserung des reifen Phänotyps. Diese führt auch nur zu einer geringfügigen Verbesserung im Stimulationspotential der reif transfizierten DC. Hauptargument für die Verwendung von ausgereift mit mRNA transfizierten DC ist in den beiden bereits genannten Veröffentlichungen vor allem die leichtere Handhabung der Zellen nach den dargestellten Protokollen. Die in diesem Abschnitt schon angesprochenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, dass die Amaxa-Transfektionsmethode ausschließlich dann erfolgreich eingesetzt werden kann, wenn ausgereifte DC verwendet werden. Da die Zusammensetzung der von der Firma Amaxa gelieferten Puffer und auch die Art des elektrischen Pulses, der bei der Transfektion gegeben wird, nicht bekannt gegeben wurden, kann nicht darüber diskutiert werden, welcher Art der Reiz ist, der die üblichen physiologischen Veränderungen in DC hemmt, die üblicherweise durch Reifungsstimuli ausgelöst werden.

Entsprechend der Ergebnisse, die bisher besprochen wurden, ist es sicher fragwürdig, ob die Amaxa-Transfektion die Methode der Wahl zum Einbringen von RNA in DC ist. Die herkömmliche Elektroporationsmethode wurde durch die kürzlich veröffentlichten Arbeiten von Schaft et al. (2005) und Michiels et al. (2005) systematisch verbessert. Die von Michiels et al. erreichten Transfektionseffizienzen liegen bei über 90%, was eine Verbesserung zu den von Van Tendeloo et al. (2001) beschriebenen 60% sind. Mit der Amaxa-Technologie konnten in dieser Arbeit solche Effizienzen bisher nicht erreicht werden. Allerdings ist für die Transfektion von DNA vor allem in aus Monozytenvorläuferzellen gewonnenen DC bisher keine Methode bekannt, die gute APC produziert bei Transfektionsraten von bis zu 70%, wie es in der vorliegenden Arbeit beschrieben wird. Somit ist diese Technik sicher von Interesse für Arbeitsgruppen, die beispielsweise an der Entwicklung von DNA-Vakzinen arbeiten.

4.2.5 Passive Beladung von DC mit mRNA

Die Arbeitsgruppe von Gilboa (Nair et al., 1998) entdeckte zufällig, dass von Monozyten abgeleitete DC auch in der Lage sind mRNA, die dem Medium zugesetzt wird, aufzunehmen und eine spezifische CTL-Antwort zu stimulieren. Zunächst sollte die Inkubation der DC mit RNA als Negativkontrolle dienen. Den gefundenen Effekt bezeichneten sie als passive Transfektion und wendeten sie in verschiedenen Untersuchungen erfolgreich an (Heiser et al., 2000; 2001a und b; 2002; Nair et al., 2000; Su et al., 2003). Heiser et al. beschreiben in ihrer Veröffentlichung von 2002 sogar eine höhere CD83 Expression bei passiv beladenen DC. Andere Arbeitsgruppen kamen zu gegenteiligen Ergebnissen. Van Tendeloo et al. (2001) konnten weder EGFP Expression nach passiver Beladung der DC mit EGFP-mRNA feststellen, noch CTL Induktion.

Im Zusammenhang mit den in Abschnitt 4.2.5 diskutierten Experimenten zur Restimulation von E7-spezifischen T-Zelllinien mit E7SH- und E7WT-mRNA transfizierten DC wurden auch passiv mit mRNA beladene DC als APC eingesetzt. Entsprechend der Aussagen in der bereits angeführten Literatur war auch in diesen Experimenten keine Expression nach passiver Transfektion von DC mit EGFP-mRNA in der FACS-Analyse zu detektieren (Abb. 3.3.4). Der Vergleich der Ergebnisse in den Kapiteln 3.3.2.1 bis 3.3.2.3 zeigt, dass in unserem System die passive Beladung der Nukleofektion ebenbürtig ist und spezifische CTL mit vergleichbarer Effizienz restimulieren kann. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu denen von van Tendeloo et al. (2001). Ihnen gelang es nicht, mit den von ihnen untersuchten DC-Typen durch passive Beladung mit Melan-A mRNA eine spezifische Antwort in einem Melan-A spezifischen T-Zellklon auszulösen. Sie setzten allerdings TNF- α und LPS als Reifestimulus ein, der als weniger geeignet gilt als der in dieser Arbeit verwendete Zytokincocktail.

4.2.6 Induktion von spezifischen T-Zelllinien durch Stimulation mit reif transfizierten DC

In Kapitel 4.2.4 wurde besprochen, dass die ausgereift mit für ein Antigen codierender DNA oder mRNA nukleofizierte DC in der Lage sind, die gegen dieses Antigen spezifischen T-Zellen einer Kultur effektiv zu restimulieren. Unreif transfizierte DC, die anschließend den Stimulus zur terminalen Ausreifung erhielten, konnten dies nicht.

Im nächsten Schritt wurde der Frage nachgegangen, ob es ebenfalls möglich war, in naiven T-Zellen eine spezifische Immunantwort gegen ein Antigen auszulösen, wenn ausgereifte DC mit DNA oder mRNA für dieses Antigen nukleofiziert wurden. Hierfür wurden DC und T-Zellen aus dem Blut offensichtlich gesunder Donoren eingesetzt. Die DC wurden mit Zytokincocktail terminal ausgereift, transfiziert und als Stimulatoren zu den naiven T-Zellen gegeben. Die Stimulation erfolgte dreimal in wöchentlichen Abständen. Nach einer dreiwöchigen Ruhephase wurden die T-Zelllinien in immunologischen Assays auf eine spezifische Immunantwort gegen das Antigen untersucht. In einer ersten Versuchsreihe wurden parallel T-Zelllinien mit 35mer Peptiden und E7SH-DNA als Antigen angelegt. Die Auswertung erfolgte mittels CFSE-Proliferationsassay und INF- γ ELISpot. Zur Restimulation wurden 35mer Peptide eingesetzt, die sämtliche E7-Epitope umfassen. Im Proliferationsassay wurden 3/4 Linien, die mit Peptid beladenen DC stimuliert wurden, positiv getestet und 4/4 mit DNA nukleofizierte Linien zeigten spezifische Proliferation (Tab. 3.2.5). In 2/4 Linien reagierten die CD4⁺ T-Zellen mit spezifischer Proliferation und in 2/4 konnte eine spezifische Proliferation der CD8⁺ Zellen gefunden werden. Im sensitiveren INF- γ ELISpot konnte in 4/4 mit Peptid induzierten Linien eine spezifische INF- γ Sekretion der peptidinduzierten Linien gefunden werden und

3/4 Linien enthielten nach Induktion mit E7SH DNA spezifisch reagierende T-Zellen (Tab 3.2.6). Die Abschnitte 3.2.5.9 bis 3.2.5.11 fassen eine Gruppe von Experimenten zusammen, die diese Ergebnisse noch einmal bestätigen. Wenn als Stimulatoren mit mRNA transfizierte DC eingesetzt wurden, konnte ebenfalls die Induktion von antigenspezifischen CTL nachgewiesen werden (Abschn. 3.3.3, eingehendere Diskussion Abschn. 4.2.7). Somit konnte gezeigt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode, die vorsieht, DC erst nach der terminalen Ausreifung zu transfizieren und anschließend als Stimulatoren einzusetzen, tatsächlich geeignet ist, gute antigenpräsentierende Zellen zu produzieren.

4.2.7 Induktion einer CD4⁺ Antwort durch die DNA-Vakzine aber nicht durch RNA-Vakzine

Die T-Zelllinien, die mit der DNA- oder RNA- Vakzine generiert wurden, zeigen einen höheren Anteil an CD8⁺ T-Zellen (Tab. 3.2.4 und 3.3.8). Während in peptidinduzierten T-Zelllinien der Anteil von CD8⁺ T-Zellen zwischen 20% und 50% lag, wurden hier drei Wochen nach der dritten Stimulation 60-70% CD8⁺ T-Zellen in den DNA-induzierten Linien gefunden und 50-85% in den RNA-induzierten. Es ist bekannt, dass DNA- und RNA-Vakzine die Immunantwort in Richtung der CTL-Antwort verschieben. Dieser Effekt ist prinzipiell wünschenswert, da der CTL-Antwort eine wichtige Rolle bei der Tumorregression zukommt. Somit kann der Einsatz von DNA- oder RNA-basierenden Vakzinen durchaus effizienter sein, als die Verwendung von peptid- oder proteinbasierenden Vakzinen, die vorzugsweise die Induktion der T-Helferantwort initiieren. Allerdings ist für eine anhaltende Immunität auch die CD4⁺-Antwort wichtig, so dass diese Frage nur in klinischen Studien beantwortet werden kann. Die T-Zelllinien, die in dieser Arbeit unter Verwendung der HPV16E7SH-DNA Vakzine generiert wurden, zeigten bei 2/4 Donoren eine spezifische Reaktion der CD4⁺ Zellen im CFSE-Proliferationsassay (Abb. 3.2.5). In mit RNA induzierte T-Zelllinien konnte keine spezifische CD4⁺-Antwort nachgewiesen werden. Ob durch die RNA-Vakzinierung tatsächlich keine Initiierung der T-Helferantwort stattfand oder ob die zur Datenerhebung eingesetzten Assays (CFSE-, bzw. ³H-Proliferationsassay) nur keine ausreichende Sensitivität aufweisen, kann an diesem Punkt nicht geklärt werden. Das häufig gefundene Phänomen des fehlenden *Cross-Priming* durch RNA-Vakzine wird derzeit in der Literatur diskutiert (Grünebach et al., 2005). In einigen Studien konnte sowohl eine CD8⁺ und CD4⁺-Antwort gefunden werden (Nair et al., 1998, Weissmann et al., 2000, Müller et al., 2003; 2004). Allerdings ist der Prozess, der zur MHCII Prozessierung von endogenen Peptiden führt, noch nicht vollständig verstanden.

4.2.8 Restimulation von Immunantworten in E7-Wildtyp-spezifischen T-Zelllinien und tumorinfiltrierenden Lymphozyten und Induktion von E7-Wildtyp-spezifischen T-Zellantworten in naiven T-Zellen durch HPV16E7SH

In den oben stehenden Kapiteln wurden die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen im Humansystem hauptsächlich unter dem Aspekt der Etablierung der Nukleofektion von DC betrachtet. Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit sollte aber die Beurteilung des immunogenen Potentials der HPV16E7SH Vakzine im humanen System sein. Dr. Peter Öhlschläger konnte in seiner Dissertation bereits für das Maussystem die Bildung von E7-spezifischen CTL nach Immunisierung mit pTHampHPV16E7SH nachweisen (Öhlschläger et al., 2006). Er konnte ebenfalls zeigen, dass die Immunisierung von Mäusen zur Protektion vor Tumoren und ebenfalls zur Regression von etablierten Tumoren führte. In dieser Arbeit wurde das HPV16E7SH-Gen dem codonoptimierten HPV16E7WT-Gen gegenübergestellt, um festzustellen, ob dieses als Vakzine entwickelte Konstrukt auch im Humansystem eine spezifische Immunantwort, die gegen das Wildtypprotein gerichtet ist, auslösen kann. In den Kapiteln 3.2.4 und 3.3.2 wurde zunächst gezeigt, dass die mit der geschuffelten DNA- oder RNA- Vakzine beladenen DC im CFSE-Proliferationsassay und im INF- γ ELISpot HPV16E7-wildtypspezifische T-Zellen erkennen können. Zur Bestätigung der *in vitro* Experimente wurde auf Lymphozyten zurückgegriffen, die aus dem HPV16-positiven Tumormaterial von fünf Patientinnen gewonnen worden waren. Wie in Abschnitt 3.4 gezeigt werden konnte, waren in 3/5 TIL-Linien spezifische CTL im INF- γ ELISpot nachweisbar, wenn die Stimulatoren mit der E7SH-DNA transfiziert worden waren. Mit E7SH-RNA beladenen DC gelang dieser Nachweis in einem Fall. Die TIL der Pt 69, 112, 217 zeigten CTL-Antwort, es konnten aber keine HPV16E7 spezifischen Antikörper im Talon ELISA nachgewiesen werden. Bei diesen Patientinnen war scheinbar die T_H1-Antwort begünstigt. Im Serum von Pt 214 wurden mit Hilfe des Talon ELISA HPV16E7 spezifische Antikörper nachgewiesen, eine zelluläre Immunantwort der TIL wurde nicht gefunden. Dies weist auf eine T_H2-Antwort hin. Dies kann aber nicht endgültig bestätigt werden. Um diese Aussage sicher treffen zu können, wäre es sinnvoll, außer INF- γ noch weitere Zytokine zu messen. Ein Hinweis auf eine TH2-Antwort wäre zum Beispiel die Sekretion von IL-4, IL-10 oder IL-5. Die Immunreaktion der mit der DNA-Vakzine und der korrespondierenden mRNA generierten T-Zelllinien wurde ebenfalls im CFSE-Proliferationsassay und im INF- γ ELISpot ermittelt. Zur Restimulation der T-Zelllinien wurden im ELISpot die drei bekannten CTL-Epitope eingesetzt. Von den drei auswertbaren T-Zelllinien (Tab. 3.2.10 B) zeigten zwei eine spezifische Reaktion im ELISpot auf die HLA-A2 restringierten Epitope HPV16E7₁₁₋₂₀ und HPV16E7₈₂₋₉₀. Betrachtet man die aus dem Ergebnis des ELISpots resultierenden CTL-Frequenzen in Tabelle 3.2.10 A zeichnet sich die Tendenz ab, dass durch die geschuffelte Vakzine stärkere CTL-

Antworten ausgelöst werden konnten, als durch die Wildtypvariante. Auch T-Zelllinien, die mit der mRNA-Variante der Vakzine generiert wurden, haben höhere CTL-Aktivitäten, wenn E7SH zur Stimulation eingesetzt wurde (Tab. 3.3.10). Das Epitop E7₈₂₋₉₀ wird im Appendix im Übergang c-d wiederholt (Abb. 1.1). Darüber Hinaus ist es möglich, dass die im Appendix duplizierten Bereiche bisher noch unbekannte Epitope auch für andere HLA-Allele enthalten. Möglicherweise kommt es dadurch zu einer verstärkten Prozessierung dieser Epitope. Daraus könnte eine höhere Immunogenität der E7SH-Vakzine im Gegensatz zur Wildtypkontrolle resultieren. Mit Hilfe der in diesem Abschnitt diskutierten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die HPV16E7SH Vakzine das Potential hat, im Patienten effizient eine Immunantwort auszulösen. Die DNA-Vakzine scheint die induzierte Immunreaktion in Richtung CTL verschoben. Die für eine effiziente Immunreaktion ebenfalls wichtige CD4⁺-Antwort wird aber ebenfalls induziert. Welchen Einfluss das auf die weitaus komplexeren Vorgänge im vakzinierten Patienten hat, kann aber nur eine klinische Studie zeigen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten weisen darauf hin, dass eine klinische Anwendung von pTHamp-HPV16E7SH erfolgreich sein kann.

5. Zusammenfassung

HPV16 ist kausal an 50-60% aller Zervixkarzinome beteiligt. Selbst bei optimaler Behandlung mit konventionellen Therapien versterben etwa 40% der Patientinnen.

Eine therapeutische Immuntherapie kann eine viel versprechende Ergänzung zur konventionellen Therapie darstellen.

pTHamp-HPV16E7SH ist eine therapeutische Kandidaten-Vakzine, die auf einer rearrangierten (geschuffelten) und damit nicht zelltransformierenden Variante des im Zervixkarzinom konstitutiv exprimierten viralen Onkogens E7 basiert. Durch die Vakzinierung soll das zur Tumorbekämpfung relevante zelluläre Immunsystem aktiviert werden. Als Vorstufe zur klinischen Studie wurde diese Vakzine im humanen Zellsystem *in vitro* auf ihre Fähigkeit eine Immunantwort zu induzieren getestet. Zum Vergleich wurde auch mit HPV16E7 mRNA immunisiert. Zur Durchführung der *in vitro* Untersuchungen der DNA-Vakzine pTHampE7SH war es notwendig eine Methode zur Transfektion von dendritischen Zellen (DC) zu entwickeln. Durch die Nukleofektion mit der Amaxatechnologie von terminal differenzierten DC gelang in dieser Arbeit die Entwicklung einer Methode, die nach Einbringen eines DNA-basierenden Antigens in DC effiziente antigenpräsentierende Zellen produziert. Es wurde gezeigt, dass pTHamp-HPV16E7SH DNA und HPV16E7SH mRNA transfizierte DC können HPV16E7-spezifische T-Zelllinien effizient restimulieren. Die DNA-Vakzine konnte in naiven T-Zellen sowohl eine spezifische Immunreaktion der T Helferzellen als auch der zytotoxischen T-Zellen induzieren. In mit RNA induzierten T-Zelllinien wurden ausschließlich zytotoxische T-Zellen gefunden. Beide Nukleinsäure-basierte Vakzine konnten eine Immunantwort in TIL aktivieren. Zur Überwachung einer nachfolgenden klinischen Studie ist auch das Screening der Seren von geimpften Patientinnen notwendig. Deshalb wurde eine neue durchflußzytometrische Methode auf der Basis von paramagnetischen Beads zum Antikörnernachweis im Serum entwickelt. Sie ist mit der Standardausrüstung eines immunologischen Labors durchführbar und mit geringem Optimierungsaufwand für verschiedene Antigene geeignet. Anhand von Seren bekannter Spezifität wurde gezeigt, dass diese als „Talon ELISA“ bezeichnete Methode für stark bis mittelstark reagierende Seren sehr gut geeignet ist. Die pTHamp-HPV16E7SH-Vakzine und auch die davon abgeleitete RNA-Vakzine sind im Humansystem immunogen. Die DNA-Vakzine induziert sowohl Helferzell- als auch zytotoxische T-Zellantworten. Diese Ergebnisse sind ein wichtiger Schritt für die Entscheidung zu einer klinischen Erprobung dieser Vakzine. Mit dem „Talon ELISA“ steht darüber hinaus eine effiziente Methode zur Überwachung der serologischen Immunantwort zur Verfügung.

Literaturverzeichnis

Armstrong, D. J., A. Roman ([1992](#)). Mutagenesis of human papillomavirus types 6 and 16 E7 open reading frames alters the electrophoretic mobility of the expressed proteins. *Gen Virol* 73:1275-9

Ashley, D. M., B. Faiola, S. Nair, L. P. Hale, D.D. Bigner, E. Gilboa (1997). Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce antitumor immunity against central nervous system tumors. *J Exp Med* 186:1177-82

Brossart, P., F. Grunebach, G. Stuhler, V. L. Reichardt, R. Mohle, L. Kanz, W. Brugger (1998). Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 92:4238-47

Christensen, N. D., R. Kirnbauer, J.T. Schiller, S. J. Ghim, R. Schlegel, A. B., Jenson J. W. Kreider (1994). Human papillomavirus types 6 and 11 have antigenically distinct strongly immunogenic conformationally dependent neutralizing epitopes. *Virology* 205:329-35

Christensen, N. D., J. Dillner, C. Eklund, J. J. Carter, G. C. Wipf, C. A. Reed, N. M. Cladel, D. A. Galloway (1996). Surface conformational and linear epitopes on HPV-16 and HPV-18 L1 virus-like particles as defined by monoclonal antibodies. *Virology* 223:174-84

Coleman, N., H. D. Birley, A. M. Renton, N. F. Hanna, B.K. Ryait, M. Byrne, D. Taylor-Robinson, M. A. Stanley (1994). Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol* 102:768-74

Corona Gutierrez, C. M., A. Tinoco, T. Navarro, M.L. Contreras, R.R. Cortes, P. Calzado, L. Reyes, R. Posternak, G. Morosoli, M. L. Verde, R. Rosales (2004). Therapeutic vaccination with MVA E2 can eliminate precancerous lesions (CIN 1, CIN 2, and CIN 3) associated with infection by oncogenic human papillomavirus. *Hum Gene Ther* 15:421-31

de Villiers, E. M., C. Fauquet, T. R. Broker, H. U. Bernard, H. zur Hausen (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 20;324(1):17-27

Dillner, J., F. Wiklund, P. Lenner, C. Eklund, V. Frederiksson-Shanazarian, J.T. Schiller, M. Hibma, G. Hallmans, U. Stendahl ([1995](#)). Antibodies against linear and conformational epitopes of human papillomavirus type 16 that independently associate with incident cervical cancer. *Int J Cancer* 60:377-82

Dillner, J., A. Andersson-Ellstrom, B. Hagmar, J. Schiller (1999). High risk genital papillomavirus infections are not spread vertically. *Rev Med Virol* 9:23-9

Doorbar, J. S. Ely, J. Sterling, C. McLean, L. Crawford (1991). Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352:824-7

Dürst, M., L. Gissmann, H. Ikenberg, H. zur Hausen (1983). A papillomavirus DNA from a

cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:3812-5

Dürst, M., S. Seagon, S. Wanschura, H. zur Hausen, J. Bullerdiek (1995). Malignant progression of an HPV16-immortalized human keratinocyte cell line (HPK1A) in vitro. *Cancer Genet Cytogenet* 85:105-12

Eiben, G. L., M. P. Velders, H. Schreiber, M. C. Cassetti, J. K. Pullen, L. R. Smith, W. M. Kast (2002). Establishment of an HLA-A*0201 human papillomavirus type 16 tumor model to determine the efficacy of vaccination strategies in HLA-A*0201 transgenic mice. *Cancer Res* 62:5792-5799

Engelmeyer, J, et al. (1999). Vacciniavirus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. *J Immunol* 163:6762-6768

Evander, M., Frazer, I. H., Payne, E. Qi, Y. M., Hengst, k., McMillan, N. A.(1997). Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor für papillomaviruses. *J Virol* 71 (3)2449-56

Feltkamp, M. C., H. L. Smits, M. P. Vierboom, R. P. Minaar, B. M. de Jong, J. W. Drijfhout, J. ter Schegget, C. J. Melief, W. M. Kast (1993). Vaccination with cytotoxic T lymphocytes epitope-containing peptides protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J Immunol* 23:2242-2249

Gilboa, E. (2004). The promise of cancer vaccines. *Nat Rev Cancer* 4:401-11

Gilboa E., J. Vieweg (2004). Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunol Rev* 199:251-63.

Grünebach, F., M. R. Müller, P. Brossart (2005). New developments in dendritic cell-based vaccinations: RNA translated into clinics. *Cancer Immunol Immunother* 54:517-25

Hallez S, J. M. Brulet, C. Vandooren, F. Maudoux, S. Thomas, M. Heinderickx, A. Bollen, R. Wattiez, A. Jacquet (2004). Pre-clinical immunogenicity and anti-tumour efficacy of a deleted recombinant human papillomavirus type 16 E7 protein. *Anticancer Res* 24:2265-75

Halpert R, R. G. Fruchter, A. Sedlis, K. Butt, J. G. Boyce, F. H. Sillman (1986). Human papillomavirus and lower genital neoplasia in renal transplant patients. *Obstet Gynecol* 68:251-8

Hanke, T., T.J. Blanchard, J. Schneider, C. M. Hannan, M. Becker, S. C. Gilbert, A. V. Hill, G. L. Smith, A. McMichael (1998). Enhancement of MHC class I-restricted peptide-specific T cell induction by a DNA prime/MVA boost vaccination regime. *Vaccine* 16:439-45

Hanke, T., A. J. McMichael. (2000). Design and construction of an experimental HIV-1 vaccine for a year-2000 clinical trial in Kenya. *Nat Med* 6(9):951-5

Harper, D. M., E. L. Franco, C. Wheeler, D. G. Ferris, D. Jenkins, A. Schuind, T. Zahaf, B. Innis, P. Naud, N. S. De Carvalho, C. M. Roteli-Martins, J. Teixeira, M. M. Blatter, A. P. Korn, W. Quint, G. Dubin; GlaxoSmithKline HPV Vaccine Study Group (2004). Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human

papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 364 (9447):1757-65

Harper, D. M., E. L. Franco, C. M. Wheeler, A. B. Moscicki, B. Romanowski, C. M. Roteli-Martins, D. Jenkins, A. Schuind, S. A. Costa Clemens, G. Dubin; HPV Vaccine Study group (2006). Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet* 367(9518):1247-55

Heiser, A., P. Dahm, D. R. Yancey, M.A. Maurice, D. Boczkowski, S.K. Nair, E. Gilboa, J. Vieweg (2000). Human dendritic cells transfected with RNA encoding prostate-specific antigen stimulate prostate-specific CTL responses in vitro. *J Immunol* 164:5508-14

Heiser, A., M.A. Maurice, D. R. Yancey, N. Z. Wu, P. Dahm, S. K. Pruitt, D. Boczkowski, S. K. Nair, M. S. Ballo, E. Gilboa, J. Vieweg (2001a). Induction of polyclonal prostate cancer-specific CTL using dendritic cells transfected with amplified tumor RNA. *J Immunol* 166:2953-60

Heiser, A., M. A. Maurice, D. R. Yancey, D. M. Coleman, P. Dahm, J. Vieweg (2001b). Human dendritic cells transfected with renal tumor RNA stimulate polyclonal T-cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumors. *Cancer Res* 61:3388-93

Heiser, A., D. Coleman, J. Dannull, D. Yancey, M. A. Maurice, C. D. Lallas, P. Dahm, D. Niedzwiecki, E. Gilboa, J. Vieweg (2002). Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest* 109:409-17

Ho, G. Y., R. D. Burk, I. Fleming, R. S. Klein (1994). Risk of genital human papillomavirus infection in women with human immunodeficiency virus-induced immunosuppression. *Int J Cancer* 56(6):788-92

Ho, G. Y., R. D. Burk, S. Klein, A. S. Kadish, C. J. Chang, P. Palan, J. Basu, R. Tachezy, R. Lewis, S. Romney (1995). Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst.* 87(18):1365-71

Jonuleit, H., U. Kuhn, G. Muller, K. Steinbrink, L. Paragnik, E. Schmitt, J. Knop, A. H. Enk (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 27(12):3135-42

Jonuleit, H., A. Giesecke, A. Kandemir, L. Paragnik, J. Knop, A.H. Enk (2000). Induction of tumor peptide-specific cytotoxic T cells under serum-free conditions by mature human dendritic cells. *Arch Dermatol Res* 292(7):325-32

Kather, A., A. Ferrara, M. Nonn, M. Schinz, J. Nieland, A. Schneider, M. Dürst, A. M. Kaufmann (2003). Identification of a naturally processed HLA-A0201 HPV18E7 T cell epitope by tumor cell mediated in vitro vaccination. *Int J Cancer* 104:345-353

Kaufmann, A. M., C. Backsch, A. Schneider, M. Durst (2002). HPV induced cervical carcinogenesis: molecular basis and vaccine development. *Zentralbl Gynakol.* 124(11):

- Kirnbauer**, R., J. Taub, H. Greenstone, R. Roden, M. Durst, L. Gissmann, D. R. Lowy, J.T. Schiller (1993). Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* 67(12):6929-36
- Kjellberg**, L., Z. Wang, F. Wiklund, K. Edlund, T. Angstrom, P. Lenner, I. Sjoberg, G. Hallmans, K. L. Wallin, M. Sapp, J. Schiller, G. Wadell, C. G. Mahlck, J. Dillner (1999). Sexual behaviour and papillomavirus exposure in cervical intraepithelial neoplasia: a population-based case-control study. *J Gen Virol*. 80 (Pt 2):391-8
- Kobayashi**, T., R. Yamanaka, J. Homma, N. Tsuchiya, N. Yajima, S. Yoshida, R. Tanaka (2003). Tumor mRNA-loaded dendritic cells elicit tumor-specific CD8(+) cytotoxic T cells in patients with malignant glioma. *Cancer Immunol Immunother*. 52:632-7
- Koutsky**, L. A., K. K. Holmes, C. W. Critchlow, C. E. Stevens, J. Paavonen, A. M. Beckmann, T.A. DeRouen, D. A. Galloway, D. Vernon, N. B. Kiviat (1992). A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 327(18):1272-8
- Koutsky**, L. A., K. A. Ault, C. M. Wheeler, D. R. Brown, E. Barr, F. B. Alvarez, L. M. Chiacchierini, K. U. Jansen (2002). A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* 347 :1645-51
- Kozak** M. (1991). Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem* 266(30):19867-70
- Lenz**, P., S. M. Bacot, M. R. Frazier-Jessen, G. M. Feldman (2003). Nucleoporation of dendritic cells: efficient gene transfer by electroporation into human monocyte-derived dendritic cells. *FEBS letters* 538:149-154
- Lohmann**, S., K. Galle, J. Knop, A. H, Enk (2000). CD83+ human dendritic cells transfected with tumor peptide cDNA by electroporation induce specific T-cell responses: A potential tool for gene immunotherapy. *Cancer Gene Ther* 7(4):605-14
- Maiman**, M., R. G. Fruchter, E. Serur, J. C. Remy, G. Feuer, J. Boyce (1990). Human immunodeficiency virus infection and cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 38(3):377-82
- Martinet**, W., D. M. Schrijvers, M. M. Kockx (2003). Nucleofection as an efficient nonviral transfection method for human monocytic cells. *Biotechnol Lett* 25(13):1025-9
- Meschede**, W., K. Zumbach, J. Braspenning, M. Scheffner, L. Benitez-Bribiesca, J. Luande (1998). Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer. *J clin microbiol* 36:475-80
- Michel**, N., W. Osen, L. Gissmann, T. N. M. H. Zentgraf, M. Müller (2002). Enhanced immunogenicity of HPV 16 E7 fusion proteins in DNA vaccination. *Virology* 294:47-59
- Michiels**, A., S. Tuyaerts, A. Bonehill, J. Corthals, K. Breckpot, C. Heirman, S. Van Meirvenne, M. Dullaers, S. Allard, F. Brasseur, P. van der Bruggen, K. Thielemans (2005). Electroporation of immature and mature dendritic cells: implications for dendritic cell-based vaccines. *Gene Ther* 12(9):772-82

Leechanachai, P., L. Banks, F. Moreau, G. Matlashewski, (1992). The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene* 7(1):19-25.

Müller, M., Gissmann L., Cristiano R.J., Sun X. Y., Frazer I.H., Jenson A.B., Alonso A., Zentgraf H. Zhou J. (1995). Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species *J. Virol* 69(2): 948-954

Müller, M. R., F. Grünebach, A. Nencioni, P. Brossart (2003). Transfection of dendritic cells with RNA induces CD4- and CD8-mediated T cell immunity against breast carcinomas and reveals the immunodominance of presented T cell epitopes. *J Immunol* 170: 5892-5896

Müller, M. R., F. Grünebach, S. M. Schmidt, M. R. Muller, G. Tsakou, F. Grunebach, S. M. Schmidt, P. Brossart (2004). Induction of chronic lymphocytic leukemia (CLL)-specific CD4- and CD8-mediated T-cell responses using RNA-transfected dendritic cells. *Blood* 103(5):1763-9

Munger, K., B. A. Werness, N. Dyson, W. C. Phelps, E. Harlow, P. M. Howley (1989). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* 8(13):4099-105

Munoz, N., F. X. Bosch (1996). The causal link between HPV and cervical cancer and its implications for prevention of cervical cancer. *Bull Pan Am Health Organ* 30(4):362-77

Nair, S. K., D. Bockowski, M. Morse, R. I. Cumming, H. K. Lyerly, E. Gilboa (1998). Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. *Nat Biotechnol* 16: 364-369

Nair, S. K., A. Heiser, D. Boczkowski, A. Majumdar, M. Naoe, J. S. Lebkowski, J. Vieweg, E. Gilboa (2000). Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using teomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells. *Nat Med* 6: 1011-1017

Nindl, I., L. Benitez-Bribiesca, J. Berumen, N. Farmanara, S. Fisher, G. Gross, L. Lopez-Carillo, M. Muller, M. Tommasino, A. Vazquez-Curiel, et al. (1994). Antibodies against linear and conformational epitopes of the human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7 oncoproteins in sera of cervical cancer patients. *Arch Virol* 137(3-4):341-53

O'Banion, M. K., J. P. Sundberg (1987). Papillomavirus genomes in experimentally induced fibromas in white-tailed deer. *Am J Vet Res* 48(10):1453-5

Öhlschläger, P., M. Pes, W. Osen, M. Dürst, A. Schneider, L. Gissmann, A. M. Kaufmann (2006). An improved rearranged Human Papillomavirus Type 16 E7 DNA vaccine candidate (HPV-16 E7SH) induces an E7 wildtype-specific T cell response. *Vaccine*. 24:2880-93

Osen, W., Peiler T, P. Ohlschlager, S. Caldeira, S. Faath, N. Michel, M. Muller, M. Tommasino, I. Jochmus, L. Gissmann (2001). A DNA vaccine based on a shuffled E7 oncogene of the human papillomavirus type 16 (HPV 16) induces E7-specific cytotoxic T

cells but lacks transforming activity. *Vaccine* 19(30):4276-86

Ostor, A. G. (1993). Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: A critical review. *Int J Gynecol Pathol* 12:186-192

Palmowski, M. J., E. M. Choi, I. F. Hermans, S. C. Gilbert, J. L. Chen, U. Gileadi, M. Salio, A. Van Pel, S. Man, E. Bonin, P. Liljestrom, P. R. Dunbar, V. Cerundolo (2002). Competition between CTL narrows the immune response induced by prime-boost vaccination protocols. *J Immunol* 168:4391-8

Romani N., S. Gruner, D. Brang, E. Kampgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P. O. Fritsch, R. M. Steinman (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 180:83-93

Roudier, M. P., L. D. True, C. S. Higano, H. Vesselle, W. Ellis, P. Lange, R. L. Vessella (2003). Phenotypic heterogeneity of end-stage prostate carcinoma metastatic to bone. *Hum Pathol* 34(7):646-53

Rowson, K. E., B. W. Mahy (1967). Human papova (wart) virus. *Bacteriol Rev* 31(2):110-31

Sallusto F., M. Cella, C. Danieli, A. Lanzavecchia (1995). dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182:389-400

Schaft, N., J. Dorrie, P. Thumann, V. E. Beck, I. Muller, E. S. Schultz, E. Kampgen, D. Dieckmann, G. Schuler (2005). Generation of an optimized polyvalent monocyte-derived dendritic cell vaccine by transfecting defined RNAs after rather than before maturation. *J Immunol* 174(5):3087-97. Erratum in: *J Immunol* 2005 May 1;174(9):5884

Schreckenberger, C., A. M. Kaufmann (2004). Vaccination strategies for the treatment and prevention of cervical cancer. *Curr Opin Oncol* 16(5):485-91

Shamanin, V., M. Glover, C. Rausch, C. Proby, I. M. Leigh, H. zur Hausen, E. M. de Villiers (1994). Specific types of human papillomavirus found in benign proliferations and carcinomas of the skin in immunosuppressed patients. *Cancer Res* 54(17):4610-3.

Strobel, I., S. Berchtold, A. Gotze, U. Schulze, G. Schuler, A. Steinkasserer (2000). Human dendritic cells transfected with either RNA or DNA encoding influenza matrix protein M1 differ in their ability to stimulate cytotoxic T cell lymphocytes. *Gene Ther* 7: 2028-2035

Spizek, R., L. Bretaudeau, I. Barbieux, K. Meflah, M. Gregoire (2001). Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer immunol immunother* 50:417-427

Sriamporn, S., P. J. Snijders, C. Pientong, P. Pisani, T. Ekalaksananan, C. J. Meijer, D. M. Parkin (2006). Human papillomavirus and cervical cancer from a prospective study in Khon Kaen, Northeast Thailand. *Int J Gynecol Cancer* 16(1):266-9

Stanley, M., D. R. Lowy, I. Frazer (2006). Chapter 12: Prophylactic HPV vaccines:

Underlying mechanisms. Vaccine 24 Suppl 3:S106-13. Epub 2006

Steinmann, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9: 271-296

Stoppler, M. C., K. Ching, H. Stoppler, K. Clancy, R. Schlegel, J. Icenogle (1996). Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol* 70(10):6987-93

Su, Z., J. Dannull, A. Heiser, D. Yancey, S. Pruitt, J. Madden, D. Coleman, D. Niedzwiecki, E. Gilboa, J. Vieweg (2003). Immunological and clinical response in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res* 63:2127-2133

Thornburg, C., D. Boczkowski, E. Gilboa, S. K. Nair (2000). Induction of cytotoxic T lymphocytes with dendritic cells transfected with human papillomavirus E6 and E7 RNA: implications for cervical cancer immunotherapy. *J Immunother* 23(4):412-8

Torrens, I., O. Mendoza, A. Batte, O. Reyes, L. E. Fernandez, C. Mesa, G. Guillen (2005). Immunotherapy with CTL peptide and VSSP eradicated established human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumors. *Vaccine* 23(50):5768-74

Vambutas, A., J. DeVoti, M. Nouri, J. W. Drijfhout, G. B. Lipford, V. R. Bonagura, S. H. van der Burg, C. J. Melief (2005). Therapeutic vaccination with papillomavirus E6 and E7 long peptides results in the control of both established virus-induced lesions and latently infected sites in a pre-clinical cottontail rabbit papillomavirus model. *Vaccine* 23(45):5271-80

van der Burg, S. H., M. E. Rensing, K. m. C. Kwappenberg, A. de Jong, K. Straathof, J. de Jong, A. Geluk, K. E. van Meijgaarden, K. L. M. C. Franken, T. H. M. Ottenhoff, G. J. Fleuren, G. Kenter, C. J. M. Melif, R. Offringa (2001). Natural T-helper immunity against human papillomavirus type 16 (HPV16) E7-derived peptide epitopes in patients with HPV16-positive cervical lesions: identification of 3 leukocyte antigen class II-restricted epitopes. *J cancer* 91:612-618

Van Tendeloo, V. F., H. W. Snoeck, F. Lardon, G.L. Vanham, G. Nijs, M. Lenjou, L. Hendriks, C. Van Broeckhoven, A. Moulijn, I. Rodrigus, P. Verdonk, D. R. Van Bockstaele, Z. N. Berneman (1998). Nonviral transfection of distinct types of human dendritic cells: high-efficiency gene transfer by electroporation into hematopoietic progenitor- but not monocyte-derived dendritic cells. *Gene Ther* 5:700-7

Van Tendeloo, V. F., P. Ponsaerts, F. Lardon, G. Nijs, M. Lenjou, C. Van Broeckhoven, D. R. Van Bockstaele, Z. N. Berneman (2001). High efficiency gene delivery by mRNA electroporation in human hemapoetic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood* 98:49-56

Villa, L. L., R. L. Costa, C. A. Petta, R. P. Andrade, K. A. Ault, A. R. Giuliano, C. M. Wheeler, L. A. Koutsky, C. Malm, M. Lehtinen, F. E. Skjeldestad, S. E. Olsson, M. Steinwall, D. R. Brown, R. J. Kurman, B. M. Ronnett, M. H. Stoler, A. Ferenczy, D. M. Harper, G. M. Tamms, J. Yu, L. Lupinacci, R. Railkar, F. J. Taddeo, K. U. Jansen, M. T. Esser, H. L. Sings, A. J. Saah, E. Barr (2005). Prophylactic quadrivalent human

papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol* 6(5):271-8

von Knebel Doeberitz, M., C. Rittmuller, H. zur Hausen, M. Dürst (1992). Inhibition of tumorigenicity of cervical cancer cells in nude mice by HPV E6-E7 anti-sense RNA. *Int J Cancer* 51(5):831-4

von Knebel Doeberitz, M., T. Oltersdorf, E. Schwarz, L. Gissmann (1988). Correlation of modified human papilloma virus early gene expression with altered growth properties in C4-1 cervical carcinoma cells. *Cancer Res* 48(13):3780-6

von Knebel Doeberitz, M., L. Gissmann ([1987](#)). Analysis of the biological role of human papilloma virus (HPV)-encoded transcripts in cervical carcinoma cells by antisense RNA. *Haematol Blood Transfus* 31:377-9

von Knebel Doeberitz, M., C. Rittmuller, H. zur Hausen, M. Dürst (1992). Inhibition of tumorigenicity of cervical cancer cells in nude mice by HPV E6-E7 anti-sense RNA. *Int J Cancer* 51(5):831-4

Walboomers, J. M. M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. Snijders, C. J. Meijer, N. Munoz (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12-19

Waterboer, T., P. Sehr, K. M. Michael, S. Franceschi, J. D. Nieland, T. O. Joos, M. F. Templin, M. Pawlita (2005). Multiplex human papillomavirus serology based on in-situ glutathione S-transferase fusion proteins. *clin chem* 51(10):1845-53

Weissmann, D., H. Ni, D. Scales, A. Dude, J. Capodici, K. McGibney, A. Abdool, S. N. Isaacs, G. Cannon, K. Kariko (2000). HIV gag mRNA transfection of dendritic cells (DC) delivers encoded antigen to MHC class I and II molecules, causes DC maturation, and induces a potent human in vitro primary immune response. *J Immunol* 165:4710-4717

Yewdell, J.W., C.C. Norbury, J.R. Bennink (1999). Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8+ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines. *Adv Immunol* 73:1-77

Zhou, L. J., R. Schwarting, H. M. Smith, T. F. Tedder (1992). A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J Immunol*. 149(2):735-42

Zhou LJ, Tedder TF (1995). Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 154(8):3821-35

Zumbach, K., F. Kisseljov, O. Sacharov, G. Shaichev, L. Semjonova, L. Pavlava... (2000). Antibodies against oncoproteins E6 and E7 of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical-carcinoma patients from Russia. *Int J Cancer* 85:313-8

zur Hausen, H. (1986). Intracellular surveillance of persisting viral infections. Human genital cancer results from deficient cellular control of papillomavirus gene expression. *Lancet*. 2(8505):489-91

zur Hausen, H. (1991). Human papillomavirus in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 184:9-13

zur Hausen, H. (1995) Are human papillomavirus infections not necessary or sufficient causal factors for invasive cancer of the cervix? *Int J Cancer* Oct 9;63(2):315-6

Zwaveling S., S. C. F. Mota, J. Nouta, M. Johnson, G. B. Lipford, R. Offringa, S. H. van der Burg, C. J. M. Melief (2002). Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J Immunol* 169:350-358

Anhang A

2.1.1 Geräte

Autoklav	Münchener Medizin Mechanik GmbH (München)
BioRad Econo-System (MPLC Medium Pressure Liquid Chromatography)	BioRad (München)
Blotanlage Trans-blot SD Semidry Transfer Cell	BioRad (München)
Dynalmagneten	
MPC-Q (Magnetic Particle Concentrator)	
MPC-2	
MPC-96 S	Dynal (Oslo, Norwegen)
Mikrotiterplatten-Erntegerät (Harvester Filtermate 196)	Canberra Packard (Dreieich)
ELISpot-Auslesegerät (Zeiss-Vision C)	Zeiss (Jena)
Fluoreszenzaktivierter Zellsorter (FACS Calibur)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Fluoreszenzmikroskop (Axioplan)	Carl-Zeiss (Jena)
Gelfiltrationsapparatur (Mini Prep Cell)	BioRad (München)
Gelgießanlage Agarosegele	BioRad (München)
Gelgießanlage Polyacrylamidgele	
Heizblock	Eppendorf (Hamburg)
Heizschrank	WTB-Binder Labortechnik GmbH (Tuttlingen)
Laminarwerkbank (SterilGard)	The Baker Company (Sanford, Maine, USA)
Mikroskop (Axiovert 25)	Carl Zeiss (Jena)
Mikrotiterplatten-Lesegerät (Elisa Reader MPR A4i)	
Minifuge GL & Megafuge 1.0 R	Tosoh (Tokio, Japan)
Mikrowelle	Heraeus Christ GmbH (Osterode)
Pipettierhilfe	AEG GmbH (Nürnberg)
Schüttelwasserbad	Desaga-Sarstedt-Gruppe (Nürmbrecht)
	Gesellschaft für Labortechnik GmbH (Burgwedel)
Spektralphotometer (Spectronic Genesys 2)	Milton Roy (Ivilyand, PA, USA)
Stickstofftank	Messer Griesheim GmbH (Krefeld)
Szintillationszähler (Top Count Microplate Scintillation Luminescence Counter)	
Thermocycler	Canberra Packard (Dreieich)
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Ultrazentrifuge (Optima XL-100)	Eppendorf (Hamburg)
UV-Leuchttisch	Beckmann (Palo Alto, Ca, USA)
Westernblot-Apparatur	Vetter GmbH (Wiesloch)
Zählkammer (Neubauer)	Schleicher&Schuell (Dassel)
Zellinkubator für Zellkultur (BD 2660)	Brand (Melsungen)
	Heraeus Christ GmbH (Osterode)

Anhang B

2.1.2 Verbrauchs- und spezielles Material

Für die Zellkultur wurden Einwegmaterialien der Firma Falcon®, Becton Dickinson (Heidelberg) verwendet.

Abdeck-Klebefolien	Canberra Packard (Dreieich)
CD3/28 Tcell Expander beads	Dynal (Hamburg)
Dynalbeads M-450 CD8	Dynal (Hamburg)
Einfriertubes 2 ml	Greiner (Frickenhausen)
Filterplatten	Canberra Packard (Dreieich)
Microcon 10	Millipore GmbH (Eschborn)
Nitrozellulose HA-Platten	Millipore GmbH (Eschborn)
Nylonmembran	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Plastikküvetten	Brand GmbH (Wertheim)
Plastikpipetten	Greiner (Frickenhausen)
Schafserythrozyten	ICN Biomedicals (Eschwege)
Sterilfilter	Schleicher&Schuell (Dassel)
Talon-Beads	Dynal (Hamburg)
Whatman Filterpapier (4 mm)	Schleicher&Schuell (Dassel)

Anhang C

2.1.3 Chemikalien

AB-Plasma , humanes	Blutbank, Suhl
Acrylamidlösung 30%(w/v) (29:1 Acrylamid/Bisacrylamid)	AppliChem (Darmstadt)
Agarose	Boehringer (Mannheim)
Albumin Human 20%	Blutspendedienst DRK (Hagen)
Ammoniumacetat	Merck (Darmstadt)
Ammoniumperoxodisulfat	Merck (Darmstadt)
Aqua des./bidest.	Labor (Millipore)
Bacto-Agar	Difco (Detroit, MI, USA)
Bacto-Trypton	Difco (Detroit, Mi, USA)
BCIP/NBT Solution	Sigma (Deisenhofen)
β_2 -Mikroglobulin	Sigma (Deisenhofen)
Bradford-Reagenz	BioRad (München)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Chloroform	Merck (Darmstad)
Coomassie Brilliant Blau G250	BioRad (München, BRD)
DEPC	Sigma (Deisenhofen)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	ICN Biomedicals (Aurora)
DOTAP Liposomales Transfektionsreagenz	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Eisessig	Merck (Darmstadt)
Ethanol 80% zum Desinfizieren	Otto Fischer GmbH (Saarbrücken)
Ethanol 96%	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Ethidiumbromid	Sigma (Deisenhofen)
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Merck (Darmstadt)
FACS-Flow	Becton-Dickinson (Heidelberg)
FACS-Clean	Becton-Dickinson (Heidelberg)
FACS-Rinse	Becton-Dickinson (Heidelberg)
FCS (Fötale Kälberserum)	Sigma (Deisenhofen)
Ficoll-Paque plus	Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
Formaldehydlösung min 37%	Merck (Darmstadt)
Glukose	Sigma (Deisenhofen)
Glycerol	Sigma (Deisenhofen)
Guanidiniumhydrochlorid	Sigma (Deisenhofen)
Harnstoff	Sigma (Deisenhofen)
Hefeextrakt	Difco (Detroit, MI, USA)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
IPTG	Sigma (Deisenhofen)
Kalziumchlorid	Sigma (Deiseshofen)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Kaliumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt)
Liquenin	Sigma (Deiseshofen)
Lysozym	BioRad (München)
Magnesiumchlorid	Sigma (Deisenhofen)
Methanol	Sigma (Deisenhofen)
β -Mercaptoethanol	Merck (Deisenhofen)
Microscint O	Canberra Packard (Dreieich)

Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumazid	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Nickel-NTA-Agarose	Quiagen GmbH (Hilden)
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	Invitrogen (Paisley, Schottland, UK)
Phenol, puffergesättigt	Invitrogen (Paisley, Schottland, UK)
PMSF	Sigma (Deiseshofen)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
Streptavidin-alkalische Phosphatase-Komplex	Sigma (Deisenhofen)
TEMED	Sigma (Deisenhofen)
(N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
³ HThymidin -deoxin	Merck (Darmstadt)
Tris	Merck (Darmstadt)
Triton X-100	Merck (Darmstadt)
Trypan blue solution (0,4%)	Invitrogen (Paisley, Schottland, UK)
Tween 20	Sigma (Deisenhofen)

Lebenslauf von Diplombiologin Michaela Pes

- geboren am 27.12.1970 in Wolfsburg;
- 1990 Abitur
- 1990-1992 Besuch der Morgenstern Berufsfachschule für Chemie und Pharmazie in Braunschweig; 1992 erfolgreicher Abschluss der Ausbildung zur Biologisch-Technischen Assistentin (BTA)
- 1992 Aufnahme des Biologiestudiums an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena
- 1994 Vordiplom
- 1994 Aufnahme des Hauptstudiums; Hauptfach Mikrobiologie, Nebenfächer Biochemie, medizinische Mikrobiologie und Ökologie
- während des Hauptstudiums Tätigkeit als studentische Hilfskraft am Institut für technische Mikrobiologie unter Betreuung von Dr. D. Schlosser und Prof. Dr. W. Fritsche; Aufgabe: Erarbeitung und Betreuung eines Modellversuchs zur bakteriellen Sanierung von Böden, Schwerpunkt Abbau von zyklischen Kohlenwasserstoffen
- 1997 Diplomarbeit am Institut für Molekularbiologie unter der Betreuung von Dr. J. Müller und Prof. Dr. H. Malke; Thema: Untersuchung von Phosphat hunger induzierten Phosphodiesterasen in *Bacillus subtilis*
- ab Januar 1998 Mitarbeit als studentische Hilfskraft in der Nachwuchsgruppe von Dr. Anne Ulrich; Aufgabe: Isolierung und Reinigung des Membranproteins Bindin
- Juni 1998 Beenden des Studiums mit Diplom
- Juli-August 1998 Weiterführung der Arbeiten in der Arbeitsgruppe von Dr. Ulrich als wissenschaftliche Hilfskraft
- 20. September 1998 Geburt meiner Tochter Frederike
- ab Januar 1999 - Oktober 2000 Weiterführung der Arbeiten in der Arbeitsgruppe von Dr. Ulrich
- 22.11.2000 Geburt meiner Tochter Eila; Mutterschaftsurlaub bis Ende Februar 2002
- März 2002-März 2006 wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Frauenklinik der Friedrich-Schiller-Universität Jena, in der Forschungsgruppe „Gynäkologische Molekularbiologie“ unter Leitung von Prof. Dr. M. Dürst. Im Rahmen dieser Tätigkeit wurde die Doktorarbeit unter der fachlichen Betreuung von Dr. A. M. Kaufmann mit dem Titel „*In vitro* Untersuchung der rearrangierten DNA-Vakzine pTHamp-HPV16E7SH zur Beurteilung ihrer Immunogenität im Humansystem“ erstellt.
- Seit November 2006 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fritz-Lipmann-Institut für Altersforschung in der Arbeitsgruppe „Virusinduzierte Onkogenese“.

Danksagung

Ich danke Prof. Dürst für die Möglichkeit diese Arbeit in seinem Labor durchführen zu können, für die Begutachtung dieser Arbeit, sowie für Anregungen und Bereitschaft zur Diskussion.

Prof. Zipfel danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Mein herzlicher Dank geht an Dr. Andreas Kaufmann für die Überlassung des Themas, viele inhaltliche Anregungen, all die Ermutigungen und eine freundliche und umfassende Betreuung.

Ich danke allen meinen Kollegen der Arbeitsgruppe „gynäkologische Molekularbiologie“ für eine nette Arbeitsatmosphäre.

Ganz besonders möchte ich dabei Manuela Schinz danken, die mich geduldig in die praktischen Geheimnisse der Immunologie eingeweiht hat und immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte, sowie Katrin Beer, die mir bei den Northern Blots und vielen kleinen Dingen geholfen hat.

Dr. Öhlschläger danke ich für die Überlassung der pTHamp-HPV16E7SH und –WT Plasmide.

Prof. Peter Sehr danke ich für die Serensammlung zur Validierung des Talon ELISA und Tim Waterboer für die Ratschläge zur statistischen Auswertung.

Für das HPV16E7 Antiserum danke ich Dr. Zwerschke.

Ich danke meinen lieben Eltern, die immer für mich da waren und mich unterstützt haben.

Und schließlich möchte ich noch Micha, Frederike und Eila danken, die mir Kraft gegeben haben, wenn ich sie brauchte und ich hoffe, dass sie mir nicht allzu böse sind, weil sie so oft auf mich verzichten mussten.

